



Elói Guilherme Hidalgo Martins

Licenciado em Bioquímica

Determinação do perfil de ácidos gordos do músculo da lampreia-marinha *Petromyzon marinus*

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Química
Bioorgânica

Orientador: Professor Doutor Marco Gomes da Silva,
FCT-UNL

Co-orientador: Professora Doutora Maria João Lança,
Universidade de Évora

Júri:

Presidente: Professora doutora Paula Cristina de Sérgio Branco

Arguente: Professora Doutora Maria João Pires de Bastos Cabrita

Vogal: Professor doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2016

Determinação do perfil de ácidos gordos do músculo da lampreia-marinha *Petromyzon marinus*

Copyright © Elói Guilherme Hidalgo Martins, Faculdade de Ciências e Tecnologia,
Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e ao editor.

À minha Família e Amigos

Agradecimentos

Este espaço é dedicado a todos aqueles que de alguma forma deram a sua contribuição para que esta dissertação fosse realizada. A todos eles deixo aqui o meu sincero agradecimento.

Ao meu orientador Professor Marco Gomes da Silva, o meu profundo agradecimento pela oportunidade em integrar no seu grupo de trabalho, por toda a disponibilidade, orientação científica prestada, pelos conhecimentos transmitidos e compreensão que sempre manifestou, sem os quais não era possível a realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Professora Maria João Lança, o meu profundo agradecimento pelo apoio na execução experimental e orientação científica prestada, pela disponibilidade e apoio incondicional ao longo da dissertação.

Ao Doutor Eduardo Santos, agradeço todo o apoio, orientação científica e pelos conhecimentos transmitidos.

À professora Maria João Cabrita, quero agradecer pela forma como me receberam, pela transmissão de conhecimentos e pelos bons momentos partilhados no laboratório.

Ao Davide Mendes, quero agradecer todo o apoio incondicional e disponibilidade oferecidos, pelos conhecimentos transmitidos, amizade e colaboração técnico-científica, essenciais na realização deste trabalho.

Ao grupo do Laboratório CENSE pelo apoio, disponibilidade, pelos conhecimentos transmitidos, pela coragem que depositaram e pelos bons momentos partilhados.

Agradeço a todos os profissionais do Laboratório de Enologia, pela amizade e boa disposição, que tornaram este trabalho possível.

Aos meus pais, irmão, avós e amigos, o meu profundo agradecimento por todo o apoio prestado, compreensão, pelo amor incondicional, pela coragem que sempre me transmitiram ao longo deste trabalho, e um obrigado pelas pessoas maravilhosas que são e por fazerem parte da minha vida.

Agradeço também o apoio financeiro concedido pela FCT-MEC no âmbito do projeto LAQV (UID/QUI/50006/2013), ao projeto PTDC/BIA-BEC/103258/2008 e o projeto UID/MAR/04292/2013 (fundos nacionais FCT/MEC - PIDDAC através do Acordo de Parceria PT2020)

“Deus quer, o homem sonha, a obra nasce”

(Fernando Pessoa)

Resumo

Agnathas surgiram provavelmente como os primeiros vertebrados na era Paleozoica, no período Câmbria e após o “boom” evolucionário dos organismos multicelulares. Género *Petromyzon* inclui a única espécie anádroma e parasítica, *Petromyzon marinus* L., vulgarmente designada por lampreia-marinha, com distribuição em ambas as costas do Atlântico Norte.

O ciclo de vida da lampreia-marinha inclui a fase larvar microfágica, em ambiente de água doce e após 5 anos, ocorre o período de metamorfose das larvas em juvenis pelágicos. Os juvenis pelágicos migram para o oceano, onde iniciam a fase parasítica do seu ciclo de vida, alimentando-se do sangue de várias espécies marinhas. No final desta fase a lampreia-marinha deixa de se alimentar e inicia a migração em direção aos rios, onde se reproduz e finda a qual morre.

No presente trabalho foram utilizados dois grupos de lampreia-marinha em diferentes fases do ciclo de vida (fase adulta e fase larvar) provenientes do Rio Mondego. Estas foram capturadas, respetivamente, durante o início da migração para jusante e reprodutora. A caracterização do perfil em ácidos gordos do músculo irá permitir inferir se existe um perfil que permaneça estável durante o ciclo de vida, independentemente da fase de desenvolvimento e da dieta.

Para a determinação do perfil de ácidos gordos, foi utilizada cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa (GC/MS) com duas colunas acopladas.

Os resultados obtidos evidenciam que o perfil em ácidos gordos do músculo de lampreia-marinha permanece muito estável ao longo do ciclo de vida. Todavia alguns dos índices analisados registaram diferenças significativas, o que poderá vir a ser utilizado como possíveis marcadores para cada uma das fases do ciclo de vida. Estudos futuros poderão confirmar esta hipótese.

Palavras-chave: ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME), *Petromyzon marinus* L., GC/MS

Abstract

Agnathans probably arose as the first vertebrates in the Paleozoic era, in Cambrian period and after the evolutionary “boom” of multicellular organisms. The genus *Petromyzon* comprises only one anadromous and parasitic species, *Petromyzon marinus* L., commonly known as sea lamprey which is widely distributed on both sides of the North Atlantic.

The sea lamprey life cycle contains a microphagic larval phase, which is spent in freshwater and after five years, a metamorphosis period occurs which transforms larvae into pelagic juveniles. The pelagic juveniles then migrate downstream to the sea where they begin the parasitic stage of their life cycle, feeding on blood of several marine species. At the end of this phase the sea lamprey ceases feeding and begins to migrate into the rivers, where it spawns and in end dies.

In the present study we used two groups of sea lamprey from different life cycle phases (adult phase and larval phase) from Mondego River. Which were caught, respectively, during the upstream and spawning migration. The characterization of fatty acids profile in sea lamprey muscle will infer if there is a profile that remains stable throughout the lifecycle, regardless of the development phase and diet.

In order to evaluate fatty acid profile, gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) was used and two column coupling was assayed.

The results suggest that fatty acids content of sea lamprey muscles remains very stable throughout the lifecycle. Some analyzed index however shown significant differences, which it may be used as possible markers for each lifecycle phase. Future studies will confirm that hypothesis.

Keywords: Fatty acid methyl esters (FAME), *Petromyzon marinus* L., GC/MS

Abreviaturas e Siglas

AA - Arachidonic Acid - Ácido Araquidónico
ALA - Alfa Linoleic Acid - Ácido Alfa-linolénico
AOCS - American Oil Chemist' Society - Sociedade Americana de Químicos de Petróleo
BF3 - Trifluorato de Boro
BHT - Butylated Hydroxytoluene - Hidroxitolueno Butilado
CI - Detetor de Ionização Química
CLA - Conjugados do Ácido Linoleico
DHA - Docosahexanoic Acid - Ácido Docosahaexanóico
DPA - Ácido Docosapentaenóico
ECD - Detetor de Captura Eletrónica
ECL - Comprimento da Cadeia Eficaz
EFA - Essencial Fatty Acids - Ácidos Gordos Essenciais
EI - Detetor de Ionização por Impacto Eletrónico
EPA - Eicosapentaenoic Acid - Ácido Eicosapentaenóico
FA - Fatty Acids - Ácidos Gordos
FAME - Fatty Acids Methyl Esters - Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos
FID - Flame Ion Detector - Detetor por Ionização de Chama
GC - Cromatografia Gasosa
GC/MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa
GC×GC - Cromatografia Gasosa Abrangente
GLM - Modelo Linear Geral
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HUFA - Highly Unsaturated Fatty Acids - Ácidos Gordos Altamente Insaturados
IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry - União Internacional de Química Pura e Aplicada
LA - Linoleic Acid - Ácido Linoleico
Lc-FA - Long Chain Fatty Acids - Ácidos Gordos de Cadeia Longa
MDGC - Cromatografia Gasosa Multidimensional
MUFA - Monounsaturated Fatty Acids - Ácidos Gordos Monoinsaturados
NEFAs - Non Esterified Fatty Acids - Ácidos Gordos Não Esterificados
NMR - Ressonância Magnética Nuclear
PUFA - Poliunsaturated Fatty Acids - Ácidos Gordos Polinsaturados
RRTs - Tempos de Retenção Relativos
SFA - Saturated Fatty Acids - Ácidos Gordos Saturados
TCD - Detetor de Condutividade Térmica
TLC - Cromatografia de Camada Fina
ω3 - Ácidos gordos polinsaturados da família ω3
ω5 - Ácidos gordos polinsaturados da família ω5
ω6 - Ácidos gordos polinsaturados da família ω6
ω7 - Ácidos gordos polinsaturados da família ω7
ω8 - Ácidos gordos polinsaturados da família ω8
ω9 - Ácidos gordos polinsaturados da família ω9

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract	vii
Abreviaturas e Siglas.....	ix
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas.....	xv
1. Introdução	1
1.1. A lampreia-marinha (<i>Petromyzon marinus</i>).....	1
1.1.1. Caraterísticas Morfológicas.....	1
1.1.2. Ciclo de vida da lampreia-marinha	2
1.1.3. Distribuição geográfica da lampreia-marinha	4
1.2. Classificação dos Lípidos.....	5
1.2.1. Classificação dos Ácidos Gordos	7
1.2.2. Nomenclatura	9
1.2.3. A lampreia-marinha e o perfil em ácidos gordos	9
1.2.4. Identificação de ácidos gordos na matriz biológica lampreia-marinha	11
1.3. Extração e Derivatização.....	13
1.3.1. Transesterificação em catálise ácida	14
1.3.2. Transesterificação em catálise básica.....	16
1.3.3. Metilação com diazometano.....	16
1.4. Conceitos básicos de cromatografia	17
1.4.1. Cromatografia gasosa.....	17
1.4.1.1. Injeção	17
1.4.1.2. Coluna cromatográfica	18
1.4.1.2.1. Colunas de Fase Muito Polar	18
1.4.1.2.2. Colunas de Fase Polar	19
1.4.1.2.3. Colunas de Fase Não Polar	19
1.4.1.2.4. Fases estacionárias de líquidos iónicos	20
1.4.2. Métodos de análise cromatográfica de ácidos gordos	20
1.4.2.1. Heart-cutting.....	22
1.4.3. Espectrometria de Massa	23
1.4.3.1. Deteção de ácidos gordos por espectrometria de massa	25
1.4.3.1.1. Ácidos gordos saturados	26
1.4.3.1.2. Ácidos Gordos mono e biinsaturados.....	28

1.4.3.1.3.	Ácidos gordos polinsaturados	29
1.4.3.1.4.	Ácidos gordos ramificados.....	32
2.	Metodologia	35
2.1.	Local de captura, e obtenção de tecido muscular	35
2.2.	Determinação do género, dados biométricos e obtenção de tecido muscular	35
2.3.	Reagentes e padrões	36
2.4.	Extração dos lípidos totais.....	36
2.5.	Transesterificação dos lípidos totais.....	37
2.6.	Análise cromatográfica por GC-MS.....	38
2.7.	Tratamento dos dados.....	39
2.8.	Determinação dos índices.....	40
2.9.	Análise estatística dos dados	41
3.	Resultados e Discussão	43
3.1.	Objetivos	43
3.2.	Parâmetros Biométricos	43
3.3.	Otimização da análise cromatográfica para os ácidos gordos na matriz de músculo de lampreia-marinha	45
3.4.	Caraterização do perfil em ácidos gordos do músculo de lampreia-marinha (fase adulta)	49
3.5.	Caraterização do perfil em ácidos gordos do músculo de lampreia-marinha (fase larvar)	52
3.6.	Comparação do perfil de ácidos gordos de lampreia-marinha entre a fase adulta e larvar	54
4.	Conclusão e trabalho futuro	57
5.	Bibliografia	59

Índice de Figuras

Figura 1.1. - Ilustração da lampreia-marinha (<i>Petromyzon marinus</i> , Linnaeus. 1758).....	1
Figura 1.2. - Morfologia da lampreia-marinha (<i>Petromyzon marinus</i> , L.)	2
Figura 1.3. - Esquema do ciclo de vida da lampreia-marinha.....	3
Figura 1.4. - Distribuição Geográfica da lampreia-marinha <i>Petromyzon marinus</i>	4
Figura 1.5. - Principais bacias hidrográficas portuguesas onde se pode encontrar a lampreia-marinha.....	5
Figura 1.6. - Representação de um fosfolípido	6
Figura 1.7. - Esquema reacional para a formação de um triglicérido	7
Figura 1.8. - Representação de um ácido gordo.....	7
Figura 1.9. - Vias metabólicas para a transformação dos ácidos LA e ALA da dieta em ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa.....	11
Figura 1.10. - Principais componentes de um cromatógrafo gasoso.....	17
Figura 1.11. - Eficiência do heart-cutting. co-eluição dos picos após a separação na coluna 1D e separação dos picos após separação na coluna 2D.....	22
Figura 1.12. - Esquema do dispositivo Deans Switch.....	23
Figura 1.13. - Diagrama do processo de ionização por impacto eletrónico (EI) e criação do radical catião	24
Figura 1.14. - Diagrama esquemático do espectrómetro de massa	24
Figura 1.15. - Diagrama representativo da localização dos fragmentos de iões de acordo com a sua abundância relativa no espectro de massa	25
Figura 1.16. - Esquema do mecanismo de reação de formação do ião McLafferty a partir de um FAME através do rearranjo de McLafferty	26
Figura 1.17. - Espectro de massa do éster metílico do ácido esteárico (C18:0).....	27
Figura 1.18. - Série homóloga dos picos dos iões fragmentados dos FAME saturados.....	27
Figura 1.19. - Espectro de massa do éster metílico do ácido oléico (C18:1 ω 9)	28
Figura 1.20. - Espectro de massa do éster metílico do ácido linoléico (C18:2 ω 6)	29
Figura 1.21. - Espectro de massa do éster metílico do ácido γ -linolénico (C18:3 ω 6)	30
Figura 1.22. - Espectro de massa do éster metílico do ácido α -linolénico (C18:3 ω 3).....	30
Figura 1.23. - A: Diagrama dos iões ω (a – ácidos gordos ω 6; b – ácidos gordos ω 3); B: Diagrama dos iões α (a – metil γ -linoleato (C18:3 ω 6); b - metil α -linoleato (C18:3 ω 3)).....	31
Figura 1.24. - Espectro de massa do éster metílico do ácido gordo clupanodónico (C20:5 ω 3) ..	32
Figura 1.25. - Representação da fragmentação dos iões “a” e “b” para os ácidos gordos metil 15-metilhexadecanoato (A) e metil 14-metilhexadecanoato (B) respetivamente.	32
Figura 1.26. - Espectro de massa éster metílico do ácido iso-hexadecanóico (i-C16:0).....	33
Figura 1.27. - Espectro de massa éster metílico do ácido anteiso-hexadecanóico (a-C16:0)	33
Figura 1.28. - Espectro de massa do éster metílico do ácido 4,8,12-metiltridecanóico.....	34

Figura 2.1. - Aparelho ASE (Accelerated Solvent Extractor) (Extraído de Ventura, 2014).....	36
Figura 2.2. - Aparelho de GC-MS.....	38
Figura 2.3. - Rampa de temperatura.....	39
Figura 3.1. - Relação entre o comprimento total e a massa corporal total de adulto de lampreia-marinha.....	44
Figura 3.2. - Relação entre o comprimento e a massa corporal para indivíduos em fase larvar de lampreia-marinha	44
Figura 3.3. - Análise cromatográfica da amostra padrão BAME MIX 26 a fluxos constantes (A) e a pressões constantes (B).....	46
Figura 3.4. - Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos gordos do padrão externo FAME MIX 37	47
Figura 3.5. - Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos gordos do padrão externo BAME MIX 26	47
Figura 3.6. - Somatório das famílias de ácidos gordos e dos ácidos gordos ramificados identificados no músculo de lampreia-marinha em fase larvar e fase adulta.	55

Índice de Tabelas

Tabela 1.1. - Composição do padrão BAME MIX 26 e FAME MIX 37	12
Tabela 1.2. - Iões α para as diferentes famílias de FAME no espectro de massa	31
Tabela 2.1. - Reagentes e padrões	36
Tabela 2.2. - Parâmetros programados no ASE	37
Tabela 3.1. - Parâmetros biométricos da lampreia-marinha da bacia hidrográfica do rio Mondego	43
Tabela 3.2. - Composição de lípidos totais por 100 g de matéria seca de músculo de lampreia-marinha.....	45
Tabela 3.3. - Tempos de retenção e fragmentos de iões predominantes para a identificação dos ácidos gordos esterificados em estudo	48
Tabela 3.4. - Perfil dos ácidos gordos (média \pm desvio padrão, expresso em percentagem relativa ao total de ácidos gordos identificados) do músculo de lampreia-marinha adulta. SFA – ácidos gordos saturados; MUFA – ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – ácidos gordos polinsaturados; i – <i>iso</i> ; a – <i>anteiso</i> ; Ímpares – ácidos gordos com número de insaturações ímpar.	49
Tabela 3.5. - Perfil dos ácidos gordos (média \pm desvio padrão, expresso em percentagem relativa ao total de ácidos gordos identificados) de lampreia-marinha em fase larvar. SFA – ácidos gordos saturados; MUFA – ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – ácidos gordos polinsaturados; i – <i>iso</i> ; a – <i>3anteiso</i> ; Ímpares – ácidos gordos com número de insaturações ímpar	52

1. Introdução

1.1. A lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*)

As lampreias são os únicos representantes atuais da superclasse Agnatha (Hardisty, 1986). Em virtude da sua capacidade de adaptação, elas têm persistido ao longo do tempo, apresentando características morfológicas muito similares às das lampreias primitivas de há 450 milhões de anos (Era Paleozoica), sendo considerados fósseis vivos (Janvier, 2007).

Segundo (Nelson, 2006) a lampreia-marinha *Petromyzon marinus* (Figura 1.1.) é classificada na seguinte posição filogenética:

Filo: Chordata

Subfilo: Craniata

Superclasse: Petromyzontomorphi

Classe: Petromyzontida

Ordem: Petromyzontiformes

Família: Petromyzontidae

Subfamília: Petromyzontinae

Gênero: *Petromyzon*

Espécie: *Petromyzon marinus*



Figura 1.1. - Ilustração da lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*, Linnaeus. 1758)
(Adaptado de Iglésias, 2013)

1.1.1. Características Morfológicas

Morfológicamente a lampreia-marinha é semelhante às enguias, apresentando o corpo alongado e anguiforme, revestido por uma epiderme estratificada, desprovida de escamas e rica em glândulas mucosas (Hardisty & Potter, 1971a). O esqueleto é cartilágneo não possuem barbatanas pares, no entanto são constituídas por uma barbatana caudal protocérquica e duas barbatanas dorsais triangulares longitudinais, que se fundem num, dependendo da maturação sexual e o início do período de desova (Hardisty & Potter, 1971a). Na superfície dorsal encontra-se a abertura naso-hipofisial e são caracterizadas pela presença de sete pares de fendas branquiais em série (Figura 1.2.). Não possuem mandíbula (Agnata) e a sua boca é semelhante a uma ventosa circular,

exibindo um conjunto de placas odontoides, e com capacidade de sucção e perfuração da pele dos seus hospedeiros (Hardisty & Potter, 1971a).

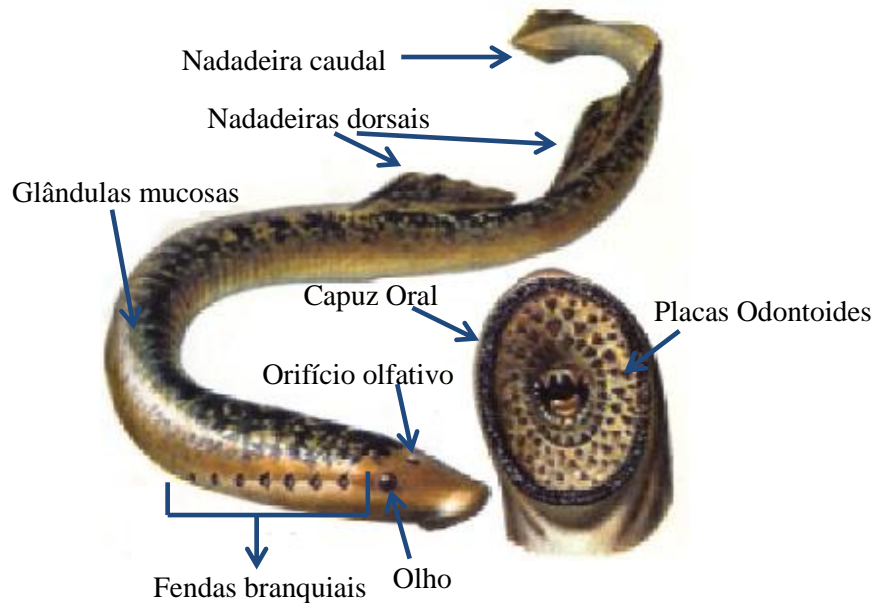


Figura 1.2. - Morfologia da lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*, L.)

1.1.2. Ciclo de vida da lampreia-marinha

A lampreia-marinha é uma espécie anádroma, o que significa que uma parte do seu ciclo de vida é passada em ambiente marinho e a outra parte em água doce (Figura 1.3.) (Hardisty & Potter, 1971a). A lampreia-marinha realiza duas migrações durante o seu ciclo de vida: a migração trófica em direção ao mar e a migração reprodutiva em água doce, sendo possível a divisão do ciclo de vida em duas fases: a fase larvar e microfágica em ambiente dulçaquícola e a fase adulta e parasítica em ambiente marinho.

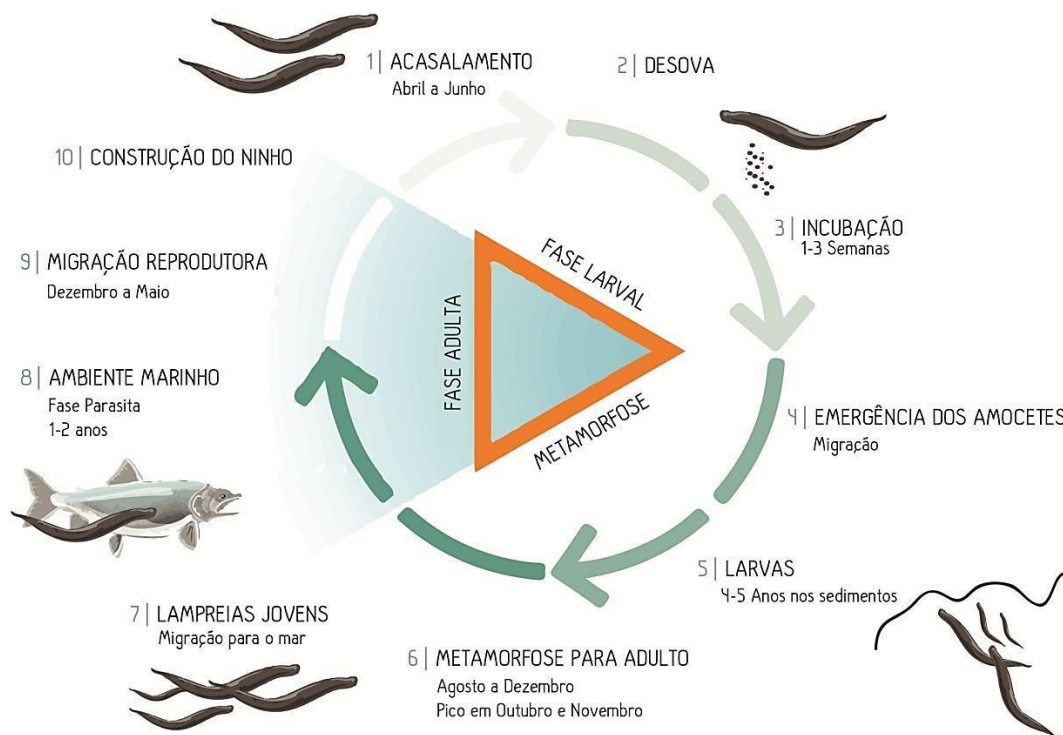


Figura 1.3. - Esquema do ciclo de vida da lampreia-marinha (Extraído de Ventura, 2014; (Autoria de Susana Raposo de Almeida, 2014)

A lampreia-marinha apresenta uma fase larvar que é passada em meio de água doce sendo as larvas denominadas amocetes, cuja principal característica morfológica é não apresentarem olhos e dentição. Na fase larvar a dieta dos amocetes consiste essencialmente à base de algas, microorganismos e principalmente de partículas orgânicas em suspensão. Os amocetes permanecem enterrados em fundos de substrato fino por um período entre 4 a 5 anos (Quintella *et. al.*, 2003 Dawson *et. al.*, 2015).

Após a fase larvar é iniciado um período de metamorfose que compreende vários estágios para preparação dos organismos para a entrada no meio marinho. Durante este período, os indivíduos, sofrem transformações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (Hardisty & Potter, 1971a). Como principais alterações tem-se o desenvolvimento dos olhos sendo os lípidos a principal fonte de energia durante este período não trófico. No final do período de metamorfose a lampreia-marinha passa a ser designada por juvenil.

Os juvenis iniciam a primeira migração em direção ao oceano, permanecendo na plataforma continental até atingirem a maturação sexual e sendo caracterizados por desenvolverem uma alimentação parasitária hematófaga pelo menos durante um período do mínimo de 1.5 anos (Silva *et. al.*, 2013).

Após alcançarem o tamanho adulto (1.3 Kg e cerca de 80 cm), a lampreia-marinha adulta retorna ao meio de água doce para iniciar a migração reprodutora e nesta fase deixa de se alimentar. Deste modo o sistema digestivo sofre atrofia, e ao mesmo tempo ocorre o desenvolvimento das gónadas. No decorrer deste período as reservas lipídicas acumuladas anteriormente são a principal fonte de energia (Larsen, 1980).

A determinação do local de postura depende da detecção olfativa de feromonas na água libertadas pelas lampreias juvenis durante a sua migração para o mar, e fatores externos como o diâmetro dos sedimentos e corrente de água (1 a 2 m/s). Uma vez alcançado o local adequado à reprodução, os machos formam um ninho no leito do rio, através arrastamento de seixos e criação de depressões, em zonas de cascalho e areia. Após a ocorrência da postura, a população reprodutora acaba por morrer. Devido à exaustão das reservas corporais e quebra dos mecanismos de regulação metabólica, carência de substâncias essenciais e excesso de substâncias tóxicas acumuladas (Larsen, 1980).

1.1.3. Distribuição geográfica da lampreia-marinha

A lampreia-marinha *Petromyzon marinus* encontra-se distribuída em ambas as costas do Atlântico Norte, desde a costa norueguesa até ao oeste do mediterrâneo, e desde a costa do Canadá até ao sul da Florida (Figura 1.4.).



Figura 1.4. - Distribuição Geográfica da lampreia-marinha *Petromyzon marinus*

Em Portugal são atualmente conhecidas seis espécies de lampreia: a lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*), a lampreia-de-rio (*Lamprera fluviatilis*), a lampreia-de-riacho (*Lamprera planeri*), e as três espécies endémicas de Portugal: a lampreia-do-Nabão (*Lamprera auremensis*), a lampreia-do-sado (*Lamprera lusitanica*) e a lampreia-da-costa-da-prata (*Lamprera alavariensis*), esta última endémica da bacia hidrográfica do rio Vouga. Tanto a *L. fluviatilis* e *P. marinus* são espécies anádromas e parasíticas e a *L. planeri* é uma espécie não parasítica residindo apenas em águas dulçaquícolas (Mateus *et. al.*, 2013).

A espécie *Petromyzon marinus* encontra-se presente nas principais bacias hidrográficas de Portugal a norte do Sado (Minho, Lima, Cávado, Douro, Vouga, Mondego e Tejo) e no Guadiana (Figura 1.5.).

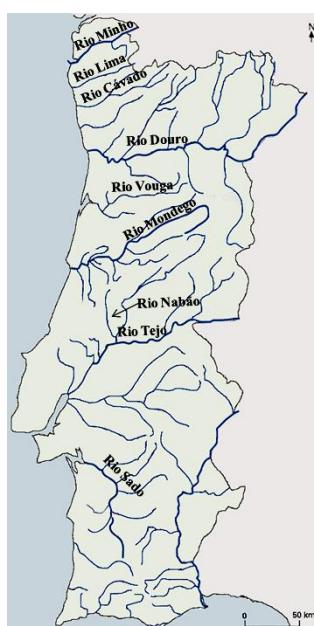


Figura 1.5. - Principais bacias hidrográficas portuguesas onde se pode encontrar a lampreia-marinha (Adaptado da Associação Portuguesa de Educação Ambiental)

1.2. Classificação dos Lípidos

Os lípidos compreendem um vasto conjunto de moléculas que podem ser definidos de diversas formas: podem ser caracterizados pela natureza hidrofóbica, maioritariamente hidrocarbonetos ricos em energia com diferentes grupos laterais ou ainda ligados a moléculas do grupo hidroxilo; por moléculas que ocorrem naturalmente em meio aquoso, mas com limitada solubilidade; compostos que se dissolvem rapidamente em solventes orgânicos não polares, tendo uma região intrinsecamente hidrofílica (Smith, 2000; Koolman & Roehm, 2005; Pratt & Conerly, 2014).

Os lípidos incluem uma vasta gama de compostos, desde ceras, ácidos gordos e óleos, fosfolípidos, glicolípidos, aos quais se adicionam ainda outros compostos como, esteroides, terpenos e carotenoides (Koolman & Roehms, 2005).

A classificação dos lípidos pode ser feita de acordo com a capacidade de os mesmos sofrerem ou não hidrólise, classificação esta que está associada a outra mais antiga na qual os lípidos eram classificados em lípidos simples ou lípidos complexos/compostos (fosfolípidos e glicolípidos) (Voet & Voet, 1995; Pratt & Conerly, 2014). Segundo esta classificação, consideram-se lípidos simples aqueles que por hidrólise total dão origem somente a ácidos gordos (FAs) e álcoois (acilgliceróis e ceras) e por lípidos complexos aqueles que apresentam na sua molécula outros compostos para além dos álcoois e ácidos gordos (Mayes & Botham, 2003). Os fosfolípidos apresentam dois FAs esterificados com uma cadeia saturada e uma insaturada, ligados a uma molécula de glicerol, e um grupo fosfato ligado a um terceiro grupo contendo uma molécula polar. (Figura 1.6.).

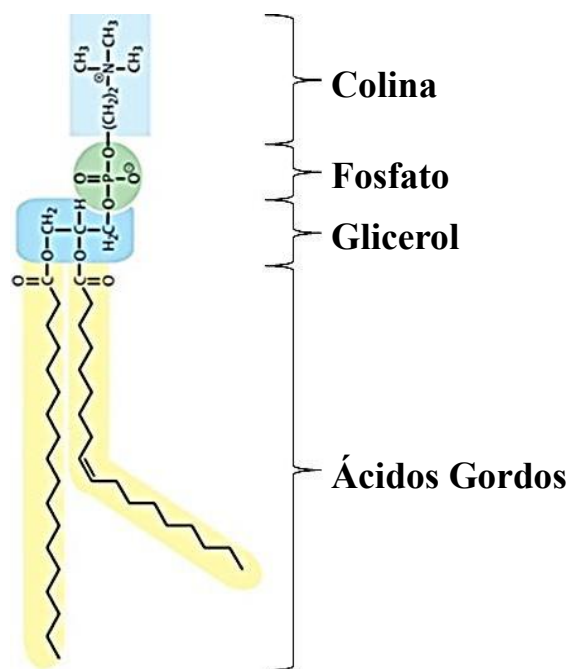


Figura 1.6. - Representação de um fosfolípido (Adaptado de Koolman & Roehm, 2005)

Os glicolípidos são compostos por esfingosina e um ácido gordo (ceramida), e um glícido de cadeia curta (Mayes & Botham, 2003).

Tanto os lípidos simples como os complexos são denominados por lípidos apolares e polares, respetivamente. Apesar de todos os lípidos possuírem uma carga negativa, os lípidos neutros (ácidos gordos, esteróis, acil-ésteres) são menos polares que os lípidos polares (fosfolípidos, glicolípidos e esfingolípidos) (Koolman & Roehms, 2005).

1.2.1. Classificação dos Ácidos Gordos

Os ácidos gordos (FA) são muitas vezes esterificados originando outras moléculas, triacilgliceróis ou fosfolípidos, dependendo da zona de ocorrência e da sua função estrutural ou metabólica (Koolman & Roehms, 2005).

Os lípidos simples ou acilgliceróis formam-se pela esterificação de grupos hidroxilo do glicerol ($\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$) com grupos ácido carboxílico de ácidos gordos. Os acilgliceróis podem ser mono, di, ou triésteres de resíduos acilo e glicerol sendo denominados, de mono, di e triacilgliceróis, respetivamente (Lehninger *et. al.*, 1993) (Figura 1.7.).

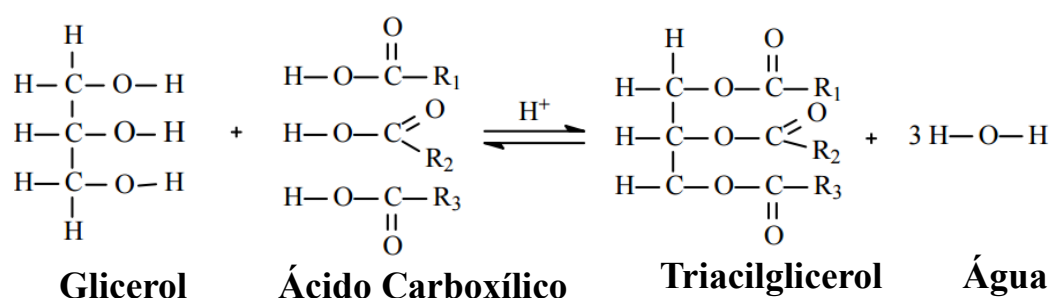


Figura 1.7. - Esquema reacional para a formação de um triglicérido

Os ácidos gordos (Figura 1.8.) são ácidos de cadeia linear não ramificada de hidrocarbonetos por ligações covalentes simples ou duplas, com um grupo metilo ($-\text{CH}_3$) numa extremidade (grupo metilo terminal) e um grupo carboxílico ($-\text{COOH}$) na extremidade (grupo carboxílico terminal) (Koolman & Roehms, 2005).

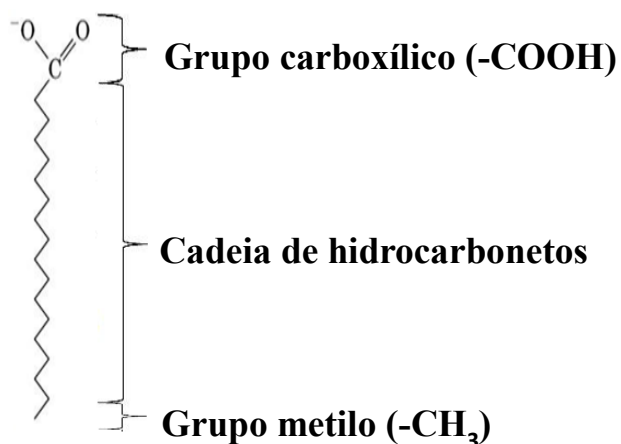


Figura 1.8. - Representação de um ácido gordo

Os ácidos gordos são designados com base no comprimento da sua cadeia, grau de insaturação (número de ligações duplas ou etilénicas) e posição das ligações duplas. Deste modo pode falar-se em FA saturados (SFA) sem ligações covalentes duplas carbono-carbono (C–C) e FA insaturados com 1 a 6 ligações covalentes duplas C–C. Os FA insaturados estão divididos em dois grupos: ácidos gordos mono- e polinsaturados, MUFA e PUFA respetivamente. Os MUFA apresentam na sua estrutura uma ligação dupla C–C, enquanto os PUFA apresentam entre 2 a 6 ligações duplas C–C. PUFA de cadeia de hidrocarbonetos com mais de 20 átomos de carbono e com 4 a 6 ligações duplas C–C são designados por ácidos gordos altamente insaturados (HUFA) ou PUFA de cadeia longa (Lc-PUFA) (Scrimgeour & Harwood, 2007).

Para a caracterização de ácidos gordos MUFA e PUFA é necessário ter em conta a posição das ligações duplas em relação ao grupo metilo terminal. Deste modo os FA são separados em famílias ómega: com a classificação de FA ómega-3 (FA n-3 ou ω 3) e FA ómega-6 (FA n-6 ou ω 6). A primeira ligação dupla C–C dos FA ω 3 encontra-se no terceiro carbono a contar do grupo metilo terminal e FA ω 6, a primeira ligação dupla C–C localiza-se no sexto carbono a contar do grupo metilo terminal. Existem outras famílias de FA como a família ω 4, ω 5, ω 7, ω 8 e ω 9 (Scrimgeour & Harwood, 2007).

Os ácidos gordos com ligações duplas podem apresentar-se com duas configurações, a *cis* e a *trans*. A mais frequente é a *cis*, em que a cadeia de carbonos está do mesmo lado da ligação dupla planar. Na configuração *trans* a cadeia de carbonos está em lados opostos da ligação dupla planar (Scrimgeour & Harwood, 2007).

O tipo de configuração da ligação dupla afeta a estrutura da cadeia. Ligações duplas *cis* deformam a cadeia de hidrocarbonetos conferindo ângulos de 30 °, dificultando a agregação da molécula, e as ligações duplas de configuração *trans* não deformam a estrutura da cadeia mantendo os ângulos de ligação de 109 °. A estrutura alterada pela dupla ligação *cis* diminui o ponto de ebulição do FA, já um FA com configuração *trans* apresenta um empacotamento mais estável, permitindo a formação de uma rede cristalina (Correia & Correia, 1985).

Segundo o sistema IUPAC (“International Union of Pure and Applied Chemistry”) para distinção das ligações duplas na cadeia pela sua configuração (*cis* e *trans*) utiliza-se as letras Z (Zusammen, “juntos”) e E (Entgegen, “opostos”). Como no caso dos ácidos gordos só existem dois substituintes, ambas as designações não criam qualquer ambiguidade (Scrimgeour & Harwood, 2007).

1.2.2. Nomenclatura

Os ácidos gordos são nomeados ou pelo seu nome comum, sistemático, ou obedecendo à nomenclatura segundo o sistema IUPAC.

Para o ácido gordo C18:3 ω 3, a título de exemplo, o seu nome comum é ácido α -linolénico, e o seu nome sistemático provém da substituição do sufixo O (com base no hidrocarboneto com o mesmo número de carbonos na cadeia), pelo sufixo OICO, sendo possível referir o C18:3 ω 3 como ácido cis,cis,cis-9,12,15-octadecatrienóico.

Já mediante a nomenclatura do sistema IUPAC, os ácidos gordos são representados de acordo com: comprimento da cadeia; número de ligações duplas; localização das ligações duplas; configuração das ligações duplas.

A nomenclatura dos ácidos gordos pode ser descrita segundo a fórmula: CA:B ω -X, em que A representa o número de átomos de carbono (C), B o número de ligações duplas e X a posição ligação dupla em relação à extremidade do grupo metilo terminal. Através da fórmula, o C18:3 ω 3 é descrito como um ácido gordo com 18 carbonos, 3 ligações duplas e com uma ligação dupla entre o carbono 3 e 4 relativamente à extremidade do grupo metilo terminal.

Também é possível designar os ácidos gordos, segundo outras convenções, utilizando o símbolo delta (Δ) quando a contagem das duplas ligações é realizada em relação à extremidade do grupo carboxílico terminal. Pela convenção, o ácido α -linolénico é designado C18:3 $\Delta^{9,12,15}$ (Mayes & Botham, 2003).

1.2.3. A lampreia-marinha e o perfil em ácidos gordos

Todos os seres vivos dependem de um adequado balanço dos nutrientes ingeridos para disporem de energia necessária para as suas diversas atividades metabólicas e comportamentais. A retenção de energia nos seres vivos verifica-se predominantemente na forma de proteínas e lípidos (Tocher, 2003).

Na lampreia-marinha, estão envolvidos consideráveis gastos energéticos. E como a partir do momento em que iniciam a migração reprodutiva elas deixam de se alimentar, a energia disponível para as funções necessárias durante a migração reside nas reservas de energia, principalmente sob a forma de lípidos apolares o que contribui para as alterações da constituição lipídica do músculo e fígado da lampreia-marinha ao longo do seu ciclo de vida (Murray & Burt, 2001).

De fato, a lampreia-marinha utiliza as reservas lipídicas como fonte de energia durante a migração reprodutiva, mas os ácidos gordos que maioritariamente compõem os lípidos, serão utilizados de forma distinta, sendo uns importantes para fornecimento de energia para a natação e outros imprescindíveis para o desenvolvimento das gónadas e da futura geração (Ackman, 1999; Tocher, 2003).

Muitos dos animais não possuem sistemas enzimáticos que possibilitam a síntese de alguns ácidos gordos insaturados, ou quando dispõem, por vezes fazem-no em quantidades inferiores às necessárias, tendo que ser estes complementados através da alimentação (Correia & Correia, 1985). Tais ácidos gordos são considerados essenciais, e são todos pertencentes ao grupo dos PUFA (Figura 1.9.) (Koolman & Roehm, 2005).

Os peixes marinhos, tal como a lampreia-marinha, são caracterizados por baixos teores de alguns ácidos gordos polinsaturados essenciais (Koolman & Roehm, 2005). Mas quando fornecidas na dieta quantidades suficientes de ácidos gordos como o ácido linoléico (LA; C18:2 ω 6) e ácido α -linolénico (ALA; C18:3 ω 3), conhecidos pelo seu elevado teor natural lipídico de PUFA ω 6 e ω 3 (Steffens, 1997; Souza *et. al.*, 2007; Ozogul *et. al.*, 2011), alguns animais têm a capacidade de sintetizar outros ácidos gordos das famílias ω 3 e ω 6 por dessaturação, alongamento e oxidação (Parrish, 2009) (Figura 1.9.). Ou seja, são os percussores de vias metabólicas que transformam o LA e ALA em ácidos gordos polinsaturados de cadeia comprida como o ácido eicosopentaenóico (EPA; C20:5 ω 3) e ácido docosaheptaenóico (DHA; C22:6 ω 3) (Ackman, 1999). Todavia, os processos enzimáticos envolvidos no alongamento e dessaturação do LA e ALA para a maioria das espécies marinhas, é baixa, insuficiente ou mesmo nula para alguns casos (Olsen, 1999; Sargent *et. al.*, 1999).

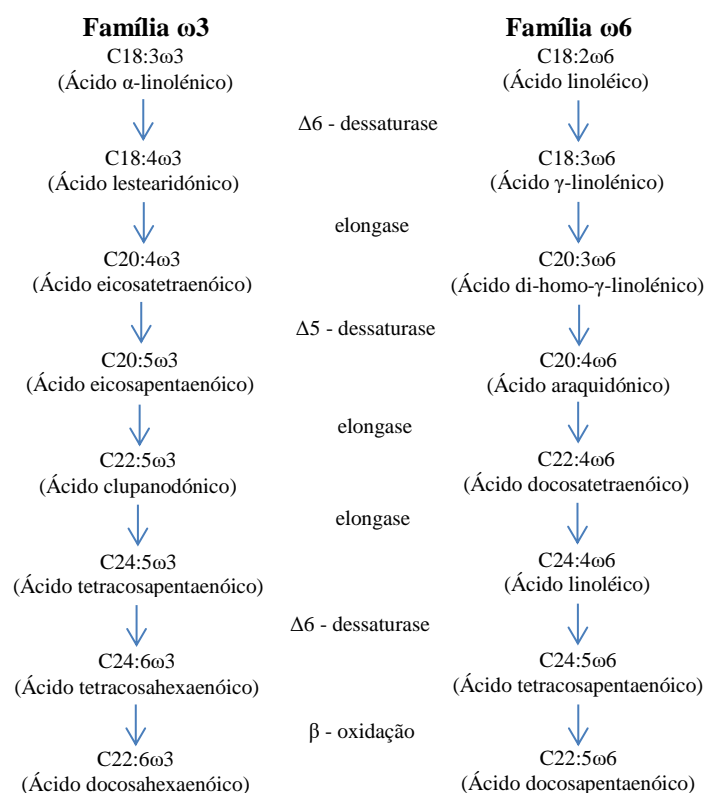


Figura 1.9. - Vias metabólicas da transformação dos ácidos LA e ALA da dieta em ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa

1.2.4. Identificação de ácidos gordos na matriz biológica lampreia-marinha

A identificação dos FAME em amostras biológicas é mais eficiente quando comparamos os tempos de retenção de cada ácido gordo com o tempo referente aos padrões individuais de cada ácido gordo. No entanto nem todos os ácidos gordos insaturados presentes nas amostras biológicas estão disponíveis comercialmente. Tais ácidos gordos contidos na amostra podem ser identificados através da comparação de análises previamente realizadas e bem caracterizadas. Existem várias misturas padrão possíveis de serem utilizadas para a caracterização dos ácidos gordos na amostra biológica de músculo de lampreia-marinha, como é o caso do FAME MIX 37 e BAME MIX 26 (Tabela 1.1.), FAME do óleo de fígado de bacalhau e FAME do óleo de sável.

Muitos dos estudos realizados no âmbito da caracterização de amostras biológicas de lampreia-marinha, utilizam o padrão FAME MIX 37 devido a ser o único padrão que permite realizar estudos quantitativos de ácidos gordos. Enquanto as outras misturas de padrão, apenas são utilizados em estudos qualitativos, uma vez que apresentam variações de acordo com os stocks, não podendo ser reproduzidos.

Tabela 1.1. Composição do padrão BAME MIX 26 e FAME MIX 37

Ésteres metílicos de ácidos bacterianos		Ésteres metílicos de ácidos gordos	
Nomenclatura IUPAC	Fórmula	Nomenclatura IUPAC	Fórmula
Éster metílico do ácido undecanóico	C11:0	Éster metílico do ácido butanoico	C4:0
Éster metílico do ácido dodecanóico	C12:0	Éster metílico do ácido caproico	C6:0
Éster metílico do ácido tridecanóico	C13:0	Éster metílico do ácido caprílico	C8:0
Éster metílico do ácido 2-hidroxidodecanóico	2-OH-C10:0	Éster metílico do ácido cáprico	C10:0
Éster metílico do ácido tetradecanóico	C14:0	Éster metílico do ácido undecanóico	C11:0
Éster metílico do ácido iso-pentadecanóico	i-C15:0	Éster metílico do ácido dodecanóico	C12:0
Éster metílico do ácido anteiso-pentadecanóico	a-C15:0	Éster metílico do ácido tridecanóico	C13:0
Éster metílico do ácido pentadecanóico	C15:0	Éster metílico do ácido tetradecanóico	C14:0
Éster metílico do ácido 2-hidroxidodecanóico	2-OH-C12:0	Éster metílico do ácido cis-9-tetradecenóico	C14:1 ω 5c
Éster metílico do ácido iso-hexadecanóico	i-C16:0	Éster metílico do ácido pentadecanóico	C15:0
Éster metílico do ácido 3-hidroxidodecanóico	3-OH-C12:0	Éster metílico do ácido cis-10-pentadecenóico	C15:1 ω 5c
Éster metílico do ácido hexadecanóico	C16:0	Éster metílico do ácido hexadecanóico	C16:0
Éster metílico do ácido cis-9-hexadecenóico	C16:1 ω 7c	Éster metílico do ácido cis-9-hexadecenóico	C16:1 ω 7c
Éster metílico do ácido iso-heptadecanóico	i-C17:0	Éster metílico do ácido heptadecanóico	C17:0
Éster metílico do ácido heptadecanóico	C17:0	Éster metílico do ácido cis-10-heptadecenóico	C17:1 ω 7c
Éster metílico do ácido cis-9-heptadecenóico	C17:1 ω 8c	Éster metílico do ácido octadecanóico	C18:0
Éster metílico do ácido 2-hidroxitetradecanóico	2-OH-C14:0	Éster metílico do ácido cis-9-octadecenóico	C18:1 ω 9c
Éster metílico do ácido 3-hidroxitetradecanóico	3-OH-C14:0	Éster metílico do ácido trans-9-octadecenóico	C18:1 ω 9t
Éster metílico do ácido octadecanóico	C18:0	Éster metílico do ácido cis-9,12-octadecadienóico	C18:2 ω 6c
Éster metílico do ácido cis-9-octadecenóico	C18:1 ω 9c	Éster metílico do ácido trans-9,12-octadecadienóico	C18:2 ω 6t
Éster metílico do ácido trans-9-octadecenóico	C18:1 ω 9t	Éster metílico do ácido 6,9,12-octadecatrienóico	C18:3 ω 6
Éster metílico do ácido cis-9,12-octadecadienóico	C18:2 ω 6c	Éster metílico do ácido 9,12,15-octadecatrienóico	C18:3 ω 3
Éster metílico do ácido nonadecanóico	C19:0	Éster metílico do ácido eicosanóico	C20:0
Éster metílico do ácido cis-10-nonadecenóico	C19:1 ω 9c	Éster metílico do ácido cis-11-eicosenóico	C20:1 ω 9c
Éster metílico do ácido 2-hidroxihexadecanóico	2-OH-C16:0	Éster metílico do ácido cis-11,14-eicosadienóico	C20:2 ω 6c
Éster metílico do ácido eicosanóico	C20:0	Éster metílico do ácido cis-8,11,14-eicosatrienóico	C20:3 ω 6c
		Éster metílico do ácido cis-11,14,17-eicosatrienóico	C20:3 ω 3c
		Éster metílico do ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico	C20:4 ω 6
		Éster metílico do ácido cis-5,8,11,14,17-eicosopentaenóico	C20:5 ω 3c
		Éster metílico do ácido heneicosanóico	C21:0
		Éster metílico do ácido docosanóico	C22:0
		Éster metílico do ácido 11-eicosenóico	C22:1 ω 9
		Éster metílico do ácido cis-13,16-docosadienóico	C22:2 ω 6c
		Éster metílico do ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico	C22:6 ω 3c
		Éster metílico do ácido tricosanóico	C23:0
		Éster metílico do ácido tetracosanóico	C24:0
		Éster metílico do ácido cis-15-tetracosenóico	C24:1 ω 9c

Os tempos de retenção relativos (RRTs) ou comprimento da cadeia eficaz (ECL) são métodos alternativos na caracterização de ácidos gordos. O RRT é definido como o rácio entre o tempo de retenção de qualquer FAME e um FAME de referência (normalmente C16:0 ou C18:0), dependendo dos parâmetros operacionais. Os valores de ECL baseiam-se no índice de retenção de Kovat's e resultam da visualização posicional do FAME relativo ao ácido gordo de cadeia saturada, para tal os tempos de retenção dos FAME têm de ser determinados, se possível, no modo isotérmico (MJOS 2006).

Caso não seja possível a identificação de um pico através dos meios descritos anteriormente, o estudo do tempo de retenção do FAME em duas colunas de diferentes polaridades poderá provar-se útil.

É possível que alguns contaminantes existentes nas amostras se coeluem como FAME, assim sendo, é sempre necessário confirmar cada FAME identificado por espetrometria de massa.

1.3. Extração e Derivatização

Para uma análise cromatográfica de ácidos gordos é necessário proceder a vários passos, que implicam a extração, esterificação e a injeção, separação, identificação e/ou quantificação de FAME.

Durante o processo de extração lipídica é necessário quebrar as interações de van der Waals e as ligações covalentes, que formam complexos entre os lípidos e proteínas ou hidrocarbonatos. São muitas vezes utilizados solventes não polares como o clorofórmio para a quebra de interações hidrofóbicas (lípidos com cadeias hidrofóbicas de triacilgliceróis), e solventes polares como o metanol, que quebram ligações de hidrogénio (fosfolípidos e glicolípidos).

Os ácidos gordos são hidrolisados por saponificação com hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio. No entanto o processo de saponificação é muito lento, e consequentemente tem tempos de reação elevados.

Para a derivatização de um composto é necessário um reagente de derivatização que o modifica quimicamente, produzindo um novo composto com propriedades essenciais para a análise por GC, como o aumento da volatilidade e diminuição da polaridade. A necessidade de otimizar o procedimento de derivatização, quer seja do ponto de vista quantitativo ou qualitativo, depende dos fatores:

1. O reagente deve permitir ter uma conversão igual ou superior a 95%;
2. Não deverá causar alterações estruturais e rearranjos do composto durante a formação do derivado;
3. Não deve contribuir para a perda de amostra durante a reação;
4. Deverá produzir um derivado que não interaja com a coluna cromatográfica;
5. Deverá produzir um derivado que seja estável dentro de um período de tempo necessário até à sua análise.

Existem dificuldades associadas à preparação de ésteres metílicos como: incompleta conversão em FAME; modificação estrutural original dos ácidos gordos durante a transesterificação; formação de artefactos (Morrison & Smith, 1964).

Os solventes utilizados em transesterificações são maioritariamente à base de metanol. Para lípidos não polares, triglicéridos e colesterol que não são muito solúveis em reagentes de transesterificação e necessitam de tempo para reagir, são necessários solventes como o benzeno, tolueno, clorofórmio ou trifluorofurano (Christie, 1993).

Durante a secagem das amostras em corrente de azoto e na necessidade de recorrer a aquecimento para a completação da reação de transesterificação, é necessário ter em atenção ao risco de decomposição dos ácidos gordos polinsaturados (PUFA) correndo o risco de oxidarem. De forma a proteger os PUFA de oxidarem é adicionado antioxidantes como o hidroxitolueno butilado (BHT).

Após a transesterificação dos ácidos gordos, muitos dos procedimentos experimentais, necessitam realizar o passo de extração. Já que grande parte das amostras biológicas predominarem ácidos gordos de cadeia longa, não polares, é utilizado reagentes alcanos tais como: *n*-petanos, *n*-hexanos ou iso-octanos. O processo de extração para total recuperação completa dos FAME requer que seja realizada pelo menos duas vezes, e o rácio entre o volume do reagente de extração e do reagente de transesterificação deverá ser suficiente. Soluções salinas são adicionadas com o objectivo de aumentar a recuperação dos FAME, processo denominado por salting out (Christie, 1993).

Vários métodos foram propostos para a análise de uma matriz de ácidos gordos complexa, tendo cada procedimento as suas vantagens e desvantagens na determinação total de ácidos gordos. Existem dois métodos, usualmente utilizados, que incluem a catálise acídica e básica (Christie, 1993):

1. A metilação dos ácidos gordos, seguido por hidrólise dos lípidos previamente saponificados (hidrólise alcalina) no qual a ligação éster entre o ácido gordo e o glicerol é quebrada (como o triacilglicerol e fosfolípidos), para tal é necessário temperaturas elevadas e a presença de uma base forte. A metilação necessita da presença de um catalisador acídico em metanol.
2. A transesterificação direta requer a presença quer de um catalisador ácido ou básico, onde o grupo álcool (como o glicerol) removido com uso a um álcool em excesso, sendo necessário realizar a reação em condições anídricas.

1.3.1. Transesterificação em catálise ácida

Os reagentes normalmente utilizados no procedimento da transesterificação de catálise ácida são o trifluorato de boro, ácido clorídrico e ácido sulfúrico, em solução metanólica. Todos são ótimos reagentes de derivatização para a metilação dos ácidos gordos, no entanto é necessário realizar as

reações de transesterificação com auxílio a aquecimento (Morrison & Smith, 1964). Entre os reagentes mencionados o trifluoreto de boro em metanol ou *n*-Butanol (BF₃/14%MeOH), permite a formação de ésteres, segundo um método conveniente e de baixo custo, sendo comum a utilização na formação de éster metílicos ao reagir com ácidos:



Segundo Morrison e Smith (1964) foi possível determinar as condições ótimas para esterificação dos triglicéridos, ésteres esteróis, monoglicéridos, diglicéridos, fosfoglicéridos, esfingolípido e ácidos gordos livres. Nas condições recomendadas de temperatura (100 °C), a transesterificação é completa em 2 min para os ácidos gordos livres, 10 min para os fosfoglicéridos, 30 min para triglicéridos e 90 min para esfingolípido. Os autores provam que a reação de transesterificação é completa com a utilização de BF₃ em 14% de metanol e utilização de *n*-hexano no processo de extração. Este procedimento provou ser bastante simples e eficaz.

O BF₃ tanto pode ser utilizado em reações de transesterificação direta, através da metilação direta dos ácidos gordos, ou em reações de esterificação com a conversão dos ácidos gordos nos seus derivados metil esterificados (Christie, 1993).

Apesar do BF₃ ser maioritariamente popular nos processos de transesterificação, apresenta algumas desvantagens. É necessário armazenar a baixas temperaturas e descartado passado um mês após a sua abertura, uma vez que o BF₃ forma compostos fluobóricos ao reagir com o oxigénio existente na atmosfera e metanol, tornando-o instável. Em concentrações elevadas o BF₃ pode produzir artefactos ou ocorrência de decomposição de PUFA, e causar isomerizações *cis-trans* das duplas ligações dos ácidos gordos conjugados. Como também produz picos espúrios no cromatograma ao reagir com o reagente antioxidante, BHT (Christie, 1993). É necessário evitar a utilização de BF₃ quando a amostra a ser analisada possui ácidos gordos com grupos funcionais pouco vulgares como duplas ligações conjugadas, podendo alterar a sua configuração.

O ácido clorídrico (HCl) anídrico e ácido sulfúrico (H₂SO₄) são reagentes comuns na esterificação de lípidos em diferentes condições experimentais, particularmente em diferentes condições acídicas, temperatura e tempo de reação (Christie, 1993; Le-Lacheur et al., 1993; Carballeira & Shalabi, 1995). O HCl apresenta a vantagem de ser limpo, fácil de preparar e ser aplicado em quase todas as classes lipídicas, incluindo os esfingolípido e glicosfingolípido. No entanto, em condições acídicas pode alterar a distribuição isomérica do sistema conjugado, formação de derivados metoxi alílicos. Com a diminuição da temperatura, diminui a isomerização dos ácidos linoleicos conjugados, não sendo estas condições suficientes para metilar todos os lípidos. O H₂SO₄ é um satisfatório reagente de metilação, mas apresenta as mesmas desvantagens, que o HCl, na modificação da distribuição isomérica dos ácidos gordos conjugados. De todos os ácidos,

o H_2SO_4 durante a esterificação lipídica, forma uma quantidade inferior de artefactos em comparação com o BF_3 .

Outros reagentes utilizados na transesterificação incluem cloreto de acetilo e cloreto de alumínio. Ambos os reagentes são adicionados previamente antes do passo de extração, resultando numa transesterificação completa. No entanto o cloreto de alumínio tem a desvantagem de não esterificar ácidos gordos livres (Christie, 1993).

1.3.2. Transesterificação em catálise básica

Os reagentes usuais na esterificação de lípidos mediante a transesterificação de catálise básica são: metóxido de sódio (NaOCH_3) e metóxido de potássio/hidróxido de potássio (KOCH_3/KOH) em metanol. O NaOCH_3 é geralmente utilizado na conversão de acilglicéridos em metil ésteres, no entanto a técnica não é adequada para a transesterificação de ácidos gordos de cadeia longa, como também não metila ácidos gordos livre e lípidos com ligação amida (esfingolípidos e glicoesfingolípidos). A grande vantagem desta técnica é a não ocorrência de isomerizações das ligações duplas conjugadas, como também não produz artefactos. Ao contrário da catálise ácida, a reação ocorre à temperatura ambiente não havendo o risco de decomposição dos ácidos gordos polinsaturados, o uso de BHT é desnecessário na reação. Outra vantagem na utilização de metóxido de sódio é a rapidez do passo de esterificação, para amostras biológicas que contenham triglicéridos e fosfoglicéridos ocorre em poucos minutos. As reações necessitam de ser realizadas em ambiente anídrico, uma vez que a presença de água causa a saponificação dos lípidos durante a reação. Tanto o KOCH_3 como o KOH são reagentes usualmente utilizados para a transesterificação de óleos. O KOCH_3 é um reagente mais ativo que o NaOCH_3 e muito utilizado na determinação quantitativa dos isómeros de ácido linoleico conjugados. Já o KOH em metanol apresenta a habilidade de transesterificar, diretamente, os lípidos de amostras liofilizadas (Christie, 1993).

1.3.3. Metilação com diazometano

Neste método o diazometano tem uma taxa de conversão elevada para ácidos gordos livres na presença de metanol. Sendo necessário realizar primeiramente os passos de hidrólise ou saponificação dos lípidos. Para além da taxa de conversão elevada o diazometano possui pequenos tempos de incubação e condições de reação suaves, apesar de ser extramente tóxico, explosivo e com potencial carcinogénico (Graff et al., 1990; Christie, 1993). É utilizado o diazometano quando numa amostra ocorre a presença de ácidos gordos não esterificados (NEFA) e ácidos gordos de lípidos esterificados, sendo necessário realizar previamente a separação de ambos,

processo que é bastante demoroso. Neste caso particular a utilização de diazometano, permite uma metilação específica dos NEFA (Potter et al., 2015).

1.4. Conceitos básicos de cromatografia

A cromatografia é um conjunto de técnicas aplicadas na separação, e caracterizado pela partição ou distribuição dos analitos na fase móvel que fluem pela fase estacionária. Tornando-se num dos principais métodos analíticos para a determinação qualitativa e quantitativa, existindo um grande número de combinações técnicas cromatográficas como a cromatografia gasosa (GC), líquida de alta performance (HPLC), camada fina (TLC), entre outros (Rouessac & Rouessac, 2005).

1.4.1. Cromatografia gasosa

Para uma cromatografia gasosa, são necessários os seguintes componentes básicos: um bloco de injeção no qual a amostra é injetada através do injetor; um sistema de fornecimento que permite transportar a fase móvel, gás de arraste inerte como o hélio ou hidrogénio; uma coluna que contém a fase estacionária, geralmente polimérica; um forno que possibilite o aquecimento gradual, permitindo a separação dos compostos dependendo da retenção por interação com a fase estacionária; e um sistema de deteção dos analitos que saem da coluna cromatográfica (Figura 1.10).

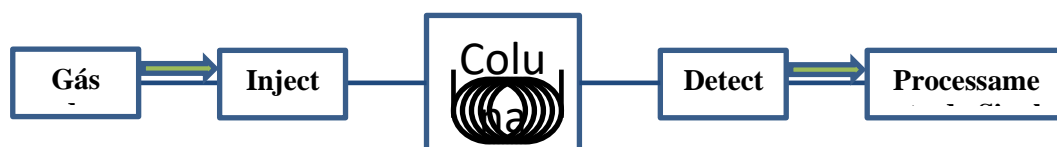


Figura 1.10. - Principais componentes de um cromatógrafo gasoso

1.4.1.1. Injeção

Existem vários tipos de injetor, mas os mais comuns são o *Split/Splitless*. A amostra quando injetada através do injetor, com auxílio a uma seringa, entra na câmara de injeção, passando para o estado gasoso. A injeção no modo *split*, antes da passagem da fase móvel, há a purga parcial da câmara de injeção permitindo evitar possíveis saturações da coluna cromatográfica ou do detetor em amostra concentradas de analitos. No modo *splitless* toda a amostra entra na câmara de injeção e introduzida na coluna pelo gás de arraste, existindo uma purga posterior para evitar potenciais contaminações da coluna cromatográfica (Grob & Barry, 2004).

1.4.1.2. Coluna cromatográfica

Na cromatografia gasosa existem dois tipos de colunas, as colunas empacotadas ou capilares. As colunas empacotadas contêm uma fase estacionária líquida que reveste as paredes internas compostas por um sólido pulverizado. As colunas capilares são compostas por material de sílica fundida ou metal inerte contendo um filme líquido a revestir a superfície interna, sendo hoje em dia as colunas mais utilizadas em cromatografia gasosa.

A escolha da fase estacionária é realizada mediante as propriedades da amostra (polaridade e ponto de ebulição). A polaridade da amostra deverá ser semelhante ao da fase estacionária de modo a aumentar a resolução e diminuir o tempo de corrida. Deste modo, a fase estacionária é um dos principais constituintes que afeta a sensibilidade e seletividade de uma separação cromatográfica (Higson, 2004).

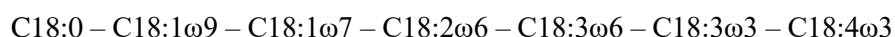
A separação de FAME pode ocorrer com uso a três tipos de colunas: colunas não polares, polares e muito polares. A polaridade da coluna influencia os tempos de retenção de cada FAME, especialmente em ácidos gordos polinsaturados.

1.4.1.2.1. Colunas de Fase Muito Polar

As colunas muito polares permitem uma separação rápida de misturas complexas de FAME, como também, a sua capacidade de resolução para FAME insaturados é superior em colunas de fase não polar. As principais fases estacionárias apresentam a seguinte composição: 100% óleo de silicone cianoetil (SP-2340, OV-275), 100% óleo de silicone cianopropil (CP-Sil 88) ou 68% bicianopropil e 32% dimetilsiloxano (SP-2330).

Em muitos casos, as colunas polares permitem a separação de amostras complexas de ésteres metílicos de ácidos gordos. Os tempos de retenção são afetados pelo tamanho da cadeia de hidrocarbonetos, número de insaturações, localização das insaturações, formas isoméricas *cis* e *trans* e pela presença de ramificações ao longo da cadeia.

Quanto maior a cadeia de hidrocarbonetos, maior o seu tempo de retenção na coluna. Enquanto para ácidos gordos com o mesmo número de átomos de carbono, a ordem de eluição varia dependentemente do número de insaturações e da sua posição ao longo da cadeia de hidrocarbonetos:



Quer em colunas de fase polar ou não polar é possível separar ácidos gordos de cadeia ramificada e identificar a forma isomérica para cada insaturação. Existem dois tipos de ácidos gordos no qual a cadeia de hidrocarbonetos encontra-se ramificada por um grupo metilo, e dependendo da posição da ramificação ao longo da cadeia o ácido gordo é denominado por *iso* ou *anteiso*. O

ácido gordo é *iso*, quando a ramificação se encontra posicionada no penúltimo carbono a contar do terminal metilo, caso a posição do metilo ramificado se encontre ligado a outro carbono da cadeia de hidrocarbonetos, o ácido gordo é denominado *anteiso*. Para uma cadeia com o mesmo número de átomos de carbono a forma *iso* elui em primeiro lugar, seguida da forma *anteiso*. Os isómeros geométricos (*trans* e *cis*) em ligações duplas são separados em colunas de fase polar, e a ordem de eluição de isómeros geométricos em coluna de fase polar segue a seguinte ordem:

$$ttt < ctt < tct < cct < ttc < ctc < tcc < ccc$$

As fases estacionárias polares, comparativamente às fases estacionárias não polares, apresentam inferior estabilidade térmica, sendo necessário prolongar o programa de temperatura do forno, que por sua vez aumenta os tempos de retenção de ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa, como também promove o respetivo alargamento dos picos.

1.4.1.2.2. Colunas de Fase Polar

Existem diversas fases estacionárias de polaridade intermédia, tais como: glicol polietileno (DB-Wax, Supelcowax 10, Carbowax 20M), glicol polietileno acidificado (FFAP) e 25% cianopropil-25% fenil-50% metil (OV-225, DB-225, SP-2300).

A ordem de eluição é semelhante às colunas de fase estacionária muito polares, à exceção que ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa, como é o caso do ácido C20:4 e C20:5 eluírem antes do ácido C20:1.

As fases estacionárias polares apresentam ótima combinação entre a capacidade de resolução e relativa estabilidade térmica. A capacidade de resolução para FAME, especialmente insaturados é superior em colunas de fase polar. No entanto o tempo de meia vida da coluna é inferior às fases estacionárias não polares.

1.4.1.2.3. Colunas de Fase Não Polar

As colunas de fase estacionárias não polares mais populares são baseadas em silicões metílicos (SPB-1, SPB-5), 95% dimetil-5% difenilpolisiloxano (DB-5, SPB-5, CP-Sil 8CB) ou 100% dimetilpolisiloxano (DB-1, rT-1, SPB-1, SP-2100, OV-1, OV-101, CP-Sil 5CB).

A ordem de eluição de fases estacionárias não polares é de acordo com o ponto de ebulição dos FAME. Ácidos gordos insaturados eluem primeiro que os ácidos gordos saturados (para a mesma cadeia de hidrocarbonetos), ou seja, a ordem de eluição é inversa ao de colunas de fase estacionária polar. Para a diferenciação de ácidos gordos isoméricos como o C18:3 ω 3 e C18:3 ω 6, são usualmente separados em fases não polares segundo condições de operação apropriadas, quase caso a caso.

A desvantagem das colunas não polares ocorre com a coeluição parcial de FAME insaturados importantes, como o C18:2 ω 6 com C18:1 ω 9 e C18:2 ω 6 com C18:3 ω 3.

Embora seja necessário ter em atenção à amostra em estudo, as fases estacionárias não polares, estas apresentam grande estabilidade térmica, uma vasta gama de temperaturas e de inércia química operacionais. Uma vez que o limite de temperatura de uma coluna capilar de estacionária não polar é cerca de 340 °C ou mais, é possível analisar ácidos gordos de massas moleculares superiores.

1.4.1.2.4. Fases estacionárias de líquidos iónicos

Tradicionalmente a análise de FAME é efetuada em fases estacionárias à base de polímeros de siloxano ou polietileno glicol (PEG), que permitem a separação dos compostos isoméricos com base no seu ponto de ebulição com resolução limitada (ex. colunas não polares de metil silicone), ou pela separação dos compostos isoméricos pelos graus de insaturações, com mínima sobreposição dos compostos com o mesmo número de carbonos (ex. colunas polares de polietileno glicol). As colunas muito polares, como é o caso do cianossilicone, permitem a separação e determinação das posições dos isómeros *cis* e *trans*, dependendo do tipo de coluna.

A deficiência das colunas tradicionais na análise de FAME promoveu que novas classes de fases estacionárias fossem desenvolvidas, principalmente na área da tecnologia dos líquidos iónicos. As duas novas fases, SLB-IL60 com uma seletividade semelhante às encontradas nas colunas PEG e a fase SLB-IL111 com seletividades muito polares, permitiram demonstrar novos padrões de eluição de isómeros de FAME comparados com as fases poliméricas para as várias amostras de FAME.

Os líquidos iónicos oferecem uma grande estabilidade em comparação com os polímeros de polisiloxano e polietileno glicóis (menores *bleeding* das colunas, tempo de meia vida superiores, aumento dos limites térmicos e maior resistência à humidade/oxigénio), como também a combinação dos catiões e aniões possibilitam ligar seletivamente compostos com diversas aplicações e funções com base na amostra a ser analisada.

1.4.2. Métodos de análise cromatográfica de ácidos gordos

A detalhada caracterização das amostras de matrizes complexas é baseada na separação, identificação e quantificação dos seus analitos. Existem diversas abordagens comuns para a identificação de ácidos gordos ou seus derivados, que incluem a cromatografia gasosa por ionização de chama (GC-FID), cromatografia gasosa acoplada a espetrometria de massa (GC/MS), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ressonância magnética nuclear

(NMR), cromatografia de camada fina (TLC) e cromatografia multidimensional (MDGC) ou compreensiva (GC×GC). Todos os métodos mencionados são usualmente utilizados para a identificação dos ácidos gordos de diferentes origens, quer sejam de origem animal ou vegetal, para os diferentes comprimentos da cadeia de hidrocarbonetos, número de insaturações, ramificações e configurações estruturais. De todas as técnicas empreendidas no estudo de ácidos gordos, a cromatografia gasosa acoplada a um detetor oferece um método simples, rápido e económico na identificação e quantificação de FAME. Outra vantagem essencial na utilização de GC provém da não necessidade de isolar os componentes lipídicos, como é necessário para outros métodos analíticos (NMR e espectroscopia). Dependente do detetor incorporado ao GC é necessário realizar o passo de derivatização da amostra, com a vantagem dos reagentes de derivatização serem acessíveis, variáveis e com requerimentos preparatórios simples.

Porém na técnica de GC com apenas uma coluna (1D), ocorre com frequência a sobreposição dos picos em matrizes complexas, sendo necessária a utilização de sistemas com uma capacidade máxima de resolução superior do que o número real de componentes de uma dada amostra.

A MDGC introduzida nas décadas de 80, permitiu superar as limitações quanto à capacidade cromatográfica. Terminologicamente a cromatografia é denominada por bi- ou multidimensional, quando a separação de todos ou de um grupo seletivo de componentes é repetida em duas ou mais colunas cromatográficas com diferentes seletividades (Giddings, 1995). A especificidade das fases estacionárias juntamente com a interação específica da molécula com a mesma e o soluto, encontra-se associado a cada dimensão de separação. Necessitando alguns requisitos como a separação dos solutos em duas ou mais separações independentes, designadas ortogonais, e a preservação da resolução da coluna na primeira dimensão durante toda a separação. Vários sistemas multidimensionais foram desenvolvidos, de diferente natureza, como a cromatografia líquida, gasosa e supercrítica.

A MDGC alcança boas eficiências e implementações simples com o acoplamento de colunas adicionais à coluna primária. Quando o sistema se encontra montado em série e após a separação dos componentes na coluna primária (coluna da primeira dimensão, 1D), é possível a transferência do efluente contínuo, ou frações do efluente ou cortes da coluna 1D para a segunda coluna secundária (coluna da segunda dimensão, 2D), através do desvio do fluxo de gás por “venting” ou revertendo o fluxo entre as colunas. O Deans Switch é um dispositivo que permite a transferência de corte seletivos dos componentes com diferentes polaridades e seletividades de separação em cada coluna, melhorando a resolução do grupo de picos eluídos contidos no corte realizado, processo denominado por *heart-cutting*. Proporcionando resultados n_1+n_2 , que definem a capacidade dos picos na coluna 1D (n_1) e na coluna 2D (n_2). As desvantagens do *heart-cutting* em MDGC derivam na resolução da separação da coluna 1D ser parcialmente perdida quando o

corte é re-injetado na coluna 2D devido a processos de “trapping” ou de focagem, na exatidão do corte realizado, e no incremento do tempo de análise.

A técnica introduzida na década de 90 por Phillips and Liu (1991), cromatografia de fase gasosa abrangente bidimensional (GC×GC) foi projetada com base na junção de duas colunas capilares cromatográficas, de diferentes seletividades, conectadas por um modulador, permitindo colmatar as limitações do MDGC. O modulador permite agrupar frações sucessivas do efluente, proveniente da primeira coluna, em bandas estreitas na segunda coluna e a re-injeção, de forma contínua. Esta última técnica permite que a amostra seja sujeita a dois métodos de separação antes de chegar ao detetor.

Apesar da popularidade da técnica GC×GC, o MDGC providencia resultados analíticos satisfatórios. O poder de resolução de colunas convencionais da segunda dimensão é muitas vezes preferível para a análise de compostos-alvo, mesmo quando a técnica GC×GC criogénico possibilita uma maior sensibilidade, além de que a utilização de uma coluna de micro-furos, como coluna de segunda dimensão, reduz o poder de separação.

1.4.2.1. Heart-cutting

O *heart-cutting* permite que uma pequena porção dos componentes seja separada por duas fases estacionárias (Figura 1.11.). A amostra é injetada na unidade de injeção para a primeira coluna, passando por um dispositivo de comutação entre as duas colunas (1D e 2D).

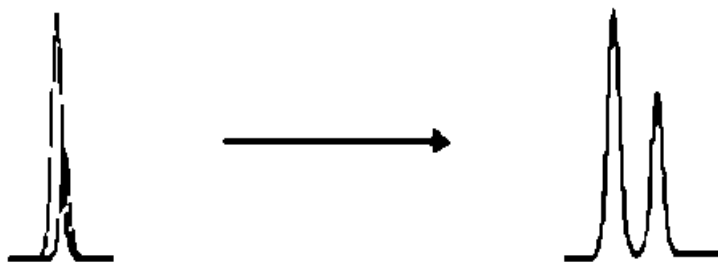


Figura 1.11. - Eficiência do heart-cutting. co-eluição dos picos após a separação na coluna 1D e separação dos picos após separação na coluna 2D

O dispositivo (Figura 1.12.) realiza imediatamente uma mudança dos fluxos de gás (switch) antes da eluição dos analitos, permitindo o seu transporte da primeira para a segunda coluna, que se encontra conectada ao detetor. Após a passagem dos analitos para a segunda coluna, o dispositivo volta a realizar o switch para o seu estado inicial, completando o processo de *heart-cutting*. O método é baseado na retração dos fluxos através do balanço das pressões nas intersecções, cada uma controlada por válvulas solenoidais.

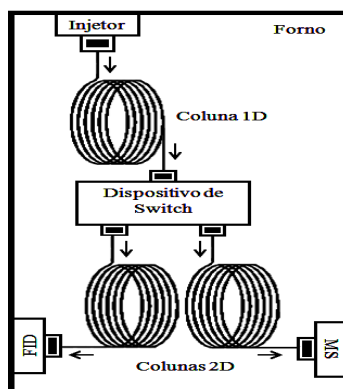


Figura 1.12. - Esquema do dispositivo Deans Switch

1.4.3. Espectrometria de Massa

Conforme as necessidades de aplicação, existe uma grande variedade de detectores comercialmente disponíveis. Na cromatografia gasosa destacam-se os detectores de ionização de chama (FID), captura eletrônica (ECD) e de condutividade térmica (TCD), podendo ser acoplado ao GC outras técnicas analíticas como a espectrometria de massa (MS). Todos os detectores, para cada aplicação dos mesmos, deverão possuir características essenciais, como: boa sensibilidade, estabilidade e reprodutibilidade, tempo de resposta curto e facilidade na sua utilização.

Muitos dos estudos realizados para as áreas da agricultura, biomedicina e ecologia, na análise de FAME, empregam o GC-FID para interpretação do habitat de mamíferos marinhos, através das mudanças climáticas e dinâmicas predador-presa. No entanto, as análises por GC-FID não permitem a identificação de compostos alvo e de contaminantes ou coeluições, pois carece de informação estrutural.

A análise por GC/MS também apresenta as suas limitações na análise de FAME. Apesar de disponibilizar informação estrutural, a espectrometria de massa não permite determinar a posição das ligações duplas da cadeia alifática e diferenciar se a configuração da ligação dupla é *cis* ou *trans*.

Após a separação dos analitos por GC, os gases vaporizados e separados pelas suas massas são quebrados em radicais de catiões que possuem uma carga ímpar de elétrons nos íons (Figura 1.13.). Existem várias formas de ionizar as moléculas, tal como a ionização química (CI) e a ionização por impacto eletrônico (EI).

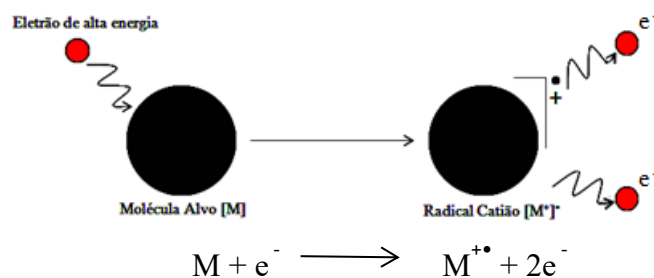


Figura 1.13. - Diagrama do processo de ionização por impacto eletrônico (EI) e criação do radical catião

A técnica EI (Figura 1.14.) foi selecionada e aplicada para este trabalho, por ser apropriada para a análise de moléculas orgânicas voláteis com massa molecular inferior a 1000, tal como acontece com os ácidos gordos metilados. Também é útil para a identificação dos compostos existentes, já que grande parte dos espectros de massa existentes na biblioteca para comparação de iões, utilizam a técnica EI. As substâncias voláteis são ionizadas por impacto eletrônico, através da interação da amostra gasosa com um feixe de elétrons de 70 eV gerado por um filamento aquecido. As moléculas são bombardeadas pelos elétrons acelerados, provocando a sua ionização, e transformando-as em fragmentos de iões radicais com carga positiva (M^{+}) após a perda de um elétron. Alguns iões fragmentados são novamente ionizados, formando iões cada vez mais pequenos. Os radicais são de seguida separados pela razão massa carga (m/z), pelo analisador de massa contendo um campo eletromagnético. O rácio m/z corresponde à proporção da massa iónica em termos da unidade de massa atómica (amu) dividida pela sua carga. Muitas das vezes, os produtos derivados do EI apresentam apenas uma carga positiva na molécula, nestes casos, a razão m/z é aproximadamente igual à sua massa molecular. Quanto maior for o fragmento m/z gerado, menor será a sua flexibilidade em comparação a fragmentos m/z mais pequenos. E o tamanho do pico do espectro de massa é proporcional à abundância relativa do respetivo fragmento.

O espectrómetro de massa (Figura 1.14.) permite visualizar através de um cromatograma, a abundância absoluta dos picos dos iões (eixo do X) e o m/z dos iões fragmentos (eixo do Y).

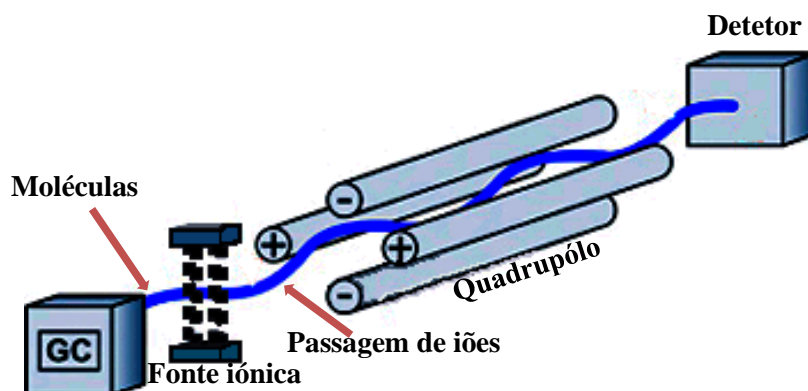


Figura 1.14. - Diagrama esquemático do espectrómetro de massa

O pico mais abundante de um cromatograma é denominado por pico base, enquanto o pico que representa a molécula na sua totalidade é denominado por pico molecular. Os fragmentos iónicos mais pequenos são frequentemente os maiores picos existentes no cromatograma, e consequentemente apresentam uma maior abundância de sinal (Figura 1.15.).

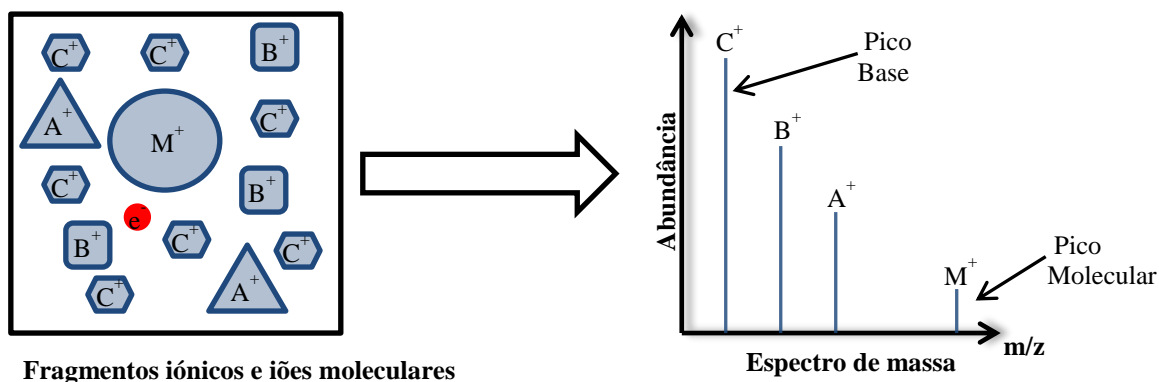


Figura 1.15. - Diagrama representativo da localização dos fragmentos de iões de acordo com a sua abundância relativa no espectro de massa

1.4.3.1. Detecção de ácidos gordos por espetrometria de massa

Para a análise de ésteres metílicos de ácidos gordos por espetrometria de massa, é necessário derivatizar previamente os ácidos gordos existentes na amostra através de uma transesterificação para formação ésteres metílicos de ácidos gordos, com o intuito de aumentar a sua volatilidade para uma análise por GC. Para tal é necessário interpretar os dados recolhidos pelo espetrómetro de massa, acoplado ao GC, das amostras derivatizadas através da interpretação adotada pela biblioteca lipídica AOCS, livros de espetrometria de massa e guias para a identificação de espectros de massa.

É necessário dividir os FAME em cinco grupos: ésteres metílicos de ácidos gordos saturados, mono-, biinsaturados, polinsaturados, e de cadeia ramificada.

Para a identificação dos FAME é necessário clivar e ionizar as moléculas em fragmentos iónicos, à exceção da molécula que representa o pico iónico molecular, e identificar os principais iões fragmentados fornecidos pela espetrometria de massa.

Para ésteres metílicos de ácidos gordos saturados como o metil estereato (C18:0), apresenta o pico iónico molecular de $m/z = 298$. Para o mesmo FAME, mas com a adição de uma ligação dupla (C18:1 ω 9), o valor do seu pico iónico molecular será inferior a duas unidades em relação ao C18:0. O valor do pico iónico molecular detetado para o C18:1 ω 9 será $m/z = 296$ em

comparação com o valor do C18:0, $m/z = 298$. O aumento do número de ligações duplas existentes nos ácidos gordos provoca uma redução do valor m/z do pico iônico molecular.

Para além do pico molecular, um dos fragmentos dominantes e caraterísticos na análise espectral de FAME saturados corresponde ao produto derivado do rearranjo de McLafferty. O rearranjo de McLafferty deriva do rearranjo intramolecular por clivagem do carbono β , resultando no ião molecular denominado por ião McLafferty $m/z = 74$ (Figura 1.16.). Outro pico caraterístico do ião McLafferty é referente à perda do mesmo ($M-74^+$). No entanto para FAME com mais do que duas insaturações, particularmente PUFA, o pico iônico McLafferty deixa de ser um dos picos dominantes na análise espectral.

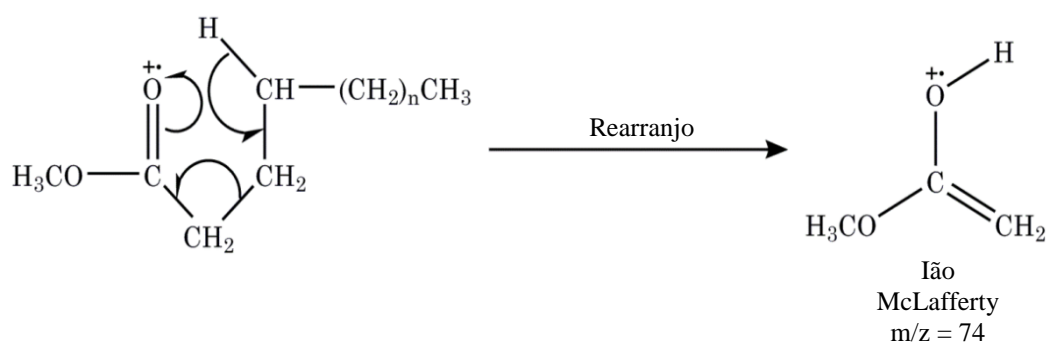


Figura 1.16. - Esquema do mecanismo de reação de formação do ião McLafferty a partir de um FAME através do rearranjo de McLafferty

1.4.3.1.1. Ácidos gordos saturados

Os FAME saturados apresentam diversos picos caraterísticos para uma simples identificação. Como referido anteriormente o pico base dominante em FAME saturados pertence ao ião McLafferty ($m/z = 74$), existindo outros picos essenciais como o pico correspondente ao ião metóxilo ($m/z = 31$) juntamente com o pico referente à perda do ião metóxi [$M-31^+$]. É também possível determinar no espetro uma série de homólogos do FAME, segundo a fórmula [$\text{CH}_3\text{-OCO}-(\text{CH}_2)_n$] $^+$, em que cada ião fragmentado apresenta uma diferença de 14 amu.

Considerando o exemplo espectral do FAME C18:0 (Figura 1.17.), é possível visualizar o pico mais abundante correspondente ao ião McLafferty ($m/z = 74$), a presença do pico molecular ($m/z = 298$) e a perda do ião metóxi [$M-31^+$] ($m/z = 267$).

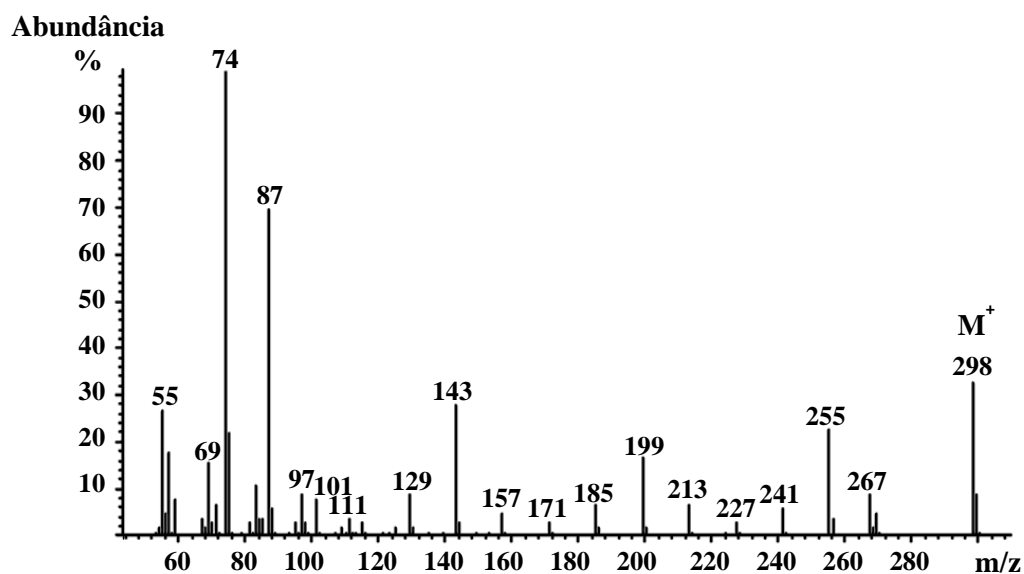


Figura 1.17. - Espectro de massa do éster metílico do ácido esteárico (C18:0)

Também é possível visualizar a presença dos homólogos em série (Figura 1.18), a começar pelo fragmento $m/z = 87$, seguido do $m/z = 101$, $m/z = 115$, $m/z = 129$, e assim sucessivamente (Figura 1.18.).

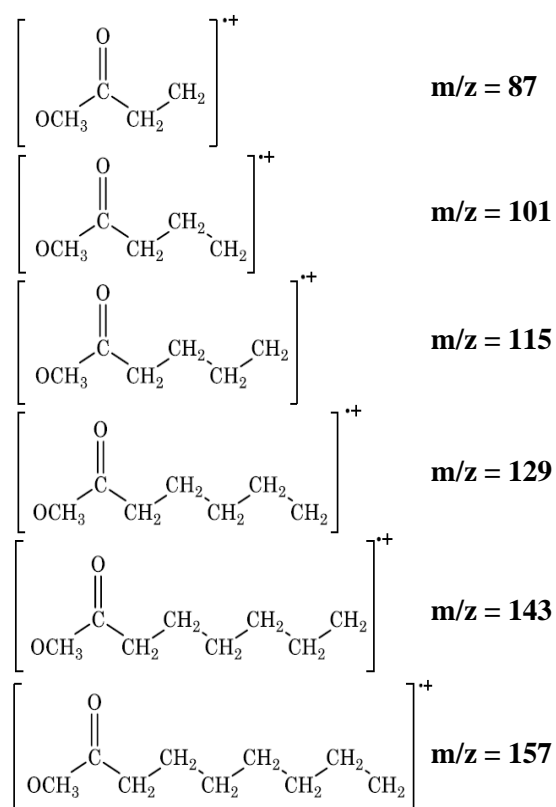


Figura 1.18. - Série homóloga dos picos dos íons fragmentados dos FAME saturados

1.4.3.1.2. Ácidos Gordos mono e biinsaturados

Quer para FAME mono e biinsaturados, é difícil determinar a posição das ligações duplas devido à habilidade do movimento eletrónico pela molécula quando ionizados, deslocalização eletrónica. Considerando o metil octadecanoato C18:1 ω 7 e C18:1 ω 9, ambos apresentam massa molecular idêntica ($m/z = 296$) mas com diferenciação na posição da ligação dupla ao longo da cadeia de hidrocarbonetos. A partir do tempo de retenção em GC é possível identificar ambas as moléculas, caso não ocorra co-eluição.

Utilizando para análise espectral o éster metílico do ácido oléico (C18:1 ω 9) como exemplo (Figura 1.19.), visualiza-se o pico molecular $m/z = 296$, e o pico $[M-32]^+$ ($m/z = 264$) que é mais dominante por comparação ao pico $[M-31]^+$ ($m/z = 265$). A série homóloga para FAME monoinsaturados deriva dos iões fragmentados da cadeia de hidrocarbonetos que são representados segunda a fórmula $[C_nH_{2n-1}]^+$. O pico mais abundante para FAME monoinsaturados corresponde ao fragmento $m/z = 55$ $[C_4H_7]^+$ em vez do ião McLafferty ($m/z = 74$). Quando os FAME apresentam na sua estrutura de hidrocarbonetos mais do que uma ligação dupla, é difícil determinar a estrutura química dos iões devido às variações das formas isoméricas (*cis* e *trans*). No entanto é possível determinar, para o mesmo ácido gordo monoinsaturado, a forma isomérica da ligação dupla através do tempo de retenção na coluna cromatográfica.

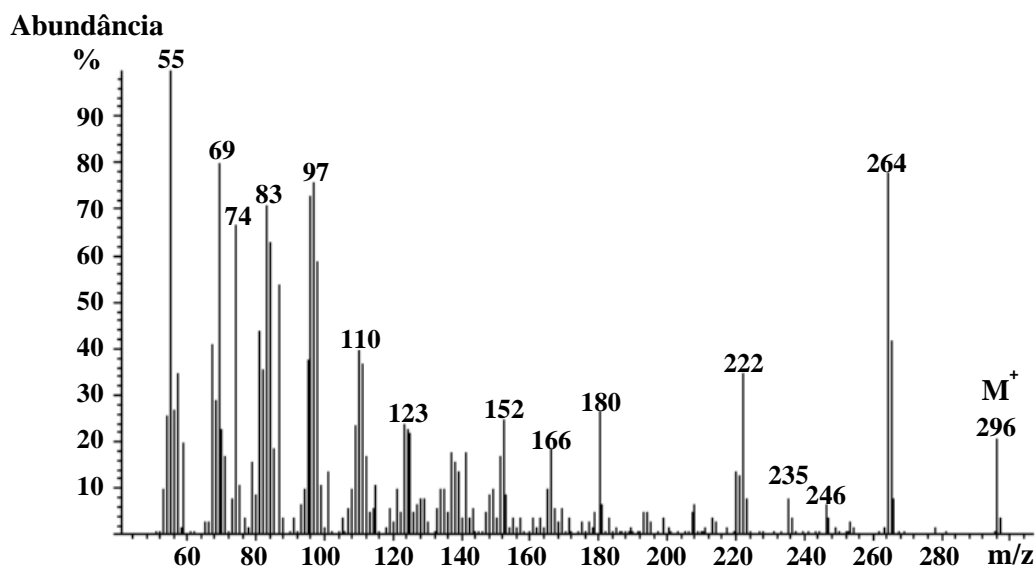


Figura 1.19. - Espectro de massa do éster metílico do ácido oléico (C18:1 ω 9)

Para ácidos gordos dienóicos, tal como o éster metílico do ácido linoléico (C18:2 ω 6), observa-se espectralmente (Figura 1.20.) o ião molecular $m/z = 294$, a perda do ião metóxilo $[M-31]^+$ ($m/z = 263$) e a proeminente perda do ião McLafferty ($m/z = 74$). A perda de dois hidrogénios devido à

presença de mais uma ligação dupla diminui o valor do íon molecular em duas unidades, sendo a fórmula geral representada por $[C_nH_{2n-3}]^+$. Os íons da série de hidrocarbonetos são o $m/z = 67, 81, 95$, sucessivamente.

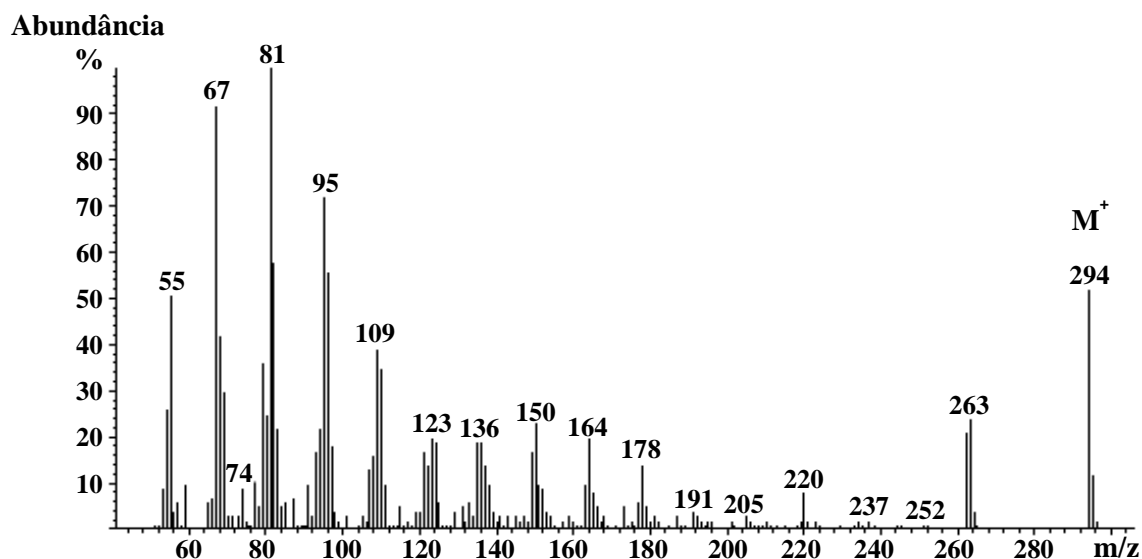


Figura 1.20. - Espectro de massa do éster metílico do ácido linoléico (C18:2ω6)

1.4.3.1.3. Ácidos gordos polinsaturados

Quer os ésteres metílicos dos ácido γ -linolénico (C18:3ω6) e do ácido α -linolénico (C18:3ω3) apresentam o mesmo pico molecular ($m/z = 292$), um pico base dominante ($m/z = 79$), apesar da perda do íon McLafferty ($m/z = 74$) e do íon metóxilo $[M-31/32]^+$ (Figura 1.21. e Figura 1.22.). Em relação aos ácidos gordos dienóicos, os ácidos trienóicos apresentam uma ligação dupla adicional na cadeia de hidrocarbonetos, assim sendo, a fórmula geral para a série de hidrocarbonetos será $[C_nH_{2n-3}]^+$.

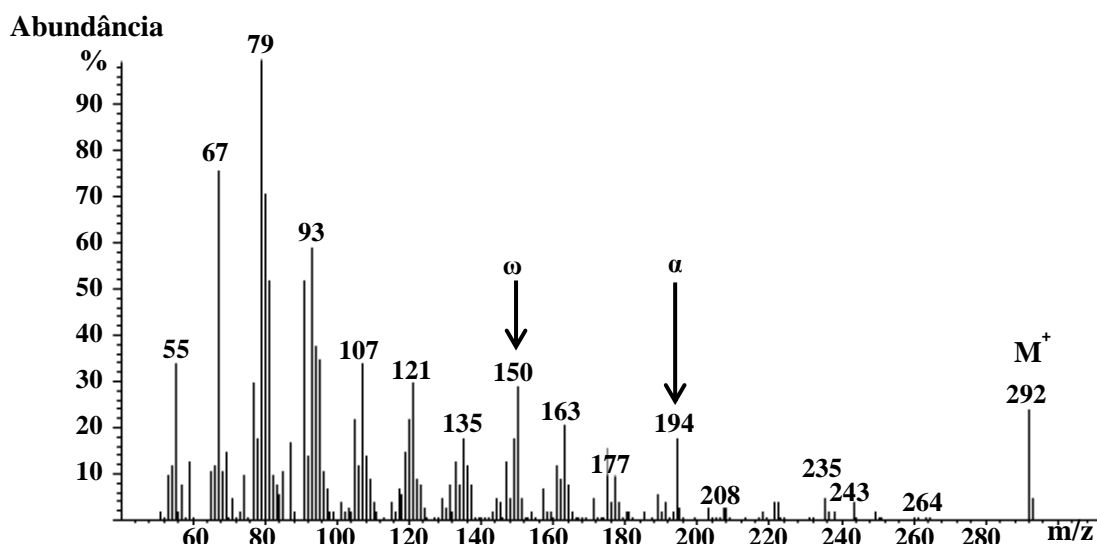


Figura 1.21. - Espectro de massa do éster metílico do ácido γ -linolênico (C18:3 ω 6)

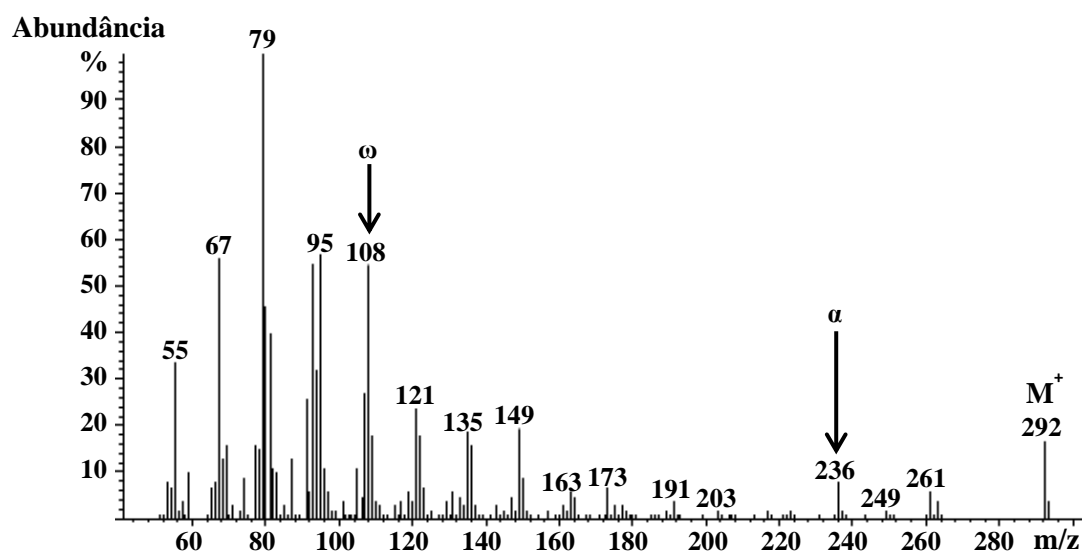


Figura 1.22. - Espectro de massa do éster metílico do ácido α -linolênico (C18:3 ω 3)

Tal como para os ácidos gordos mono- e biinsaturados, os ácidos gordos com mais de duas ligações duplas apresentam os seus próprios iões característicos para cada família de FAME. Existe a formação de dois iões (ião ω e ião α), resultantes da fragmentação por ionização, sendo denominados de acordo com o local de clivagem na cadeia. Quando a clivagem ocorre no terminal metil, o ião resultante é denominado por ião ω , caso o processo de clivagem seja perto do terminal carbonilo da molécula o ião é denominado por ião α .

A presença do ião ω e ião α permite determinar a posição das ligações duplas dos FAME (Figura 1.23.). Para fragmentos de iões ω , o fragmento $m/z = 150$ é característico para FAME ω 6, e o fragmento $m/z = 108$ é característico de ácidos gordos ω 3. Para os iões α , como os fragmentos $m/z = 194$ e $m/z = 236$ (γ -linoleato e α -linoleato, respetivamente), a clivagem ocorre antes da primeira

ligação dupla a contar do terminal carbonilo em relação à clivagem do ião ω que ocorre após a segunda ligação dupla a contar do terminal metilo.

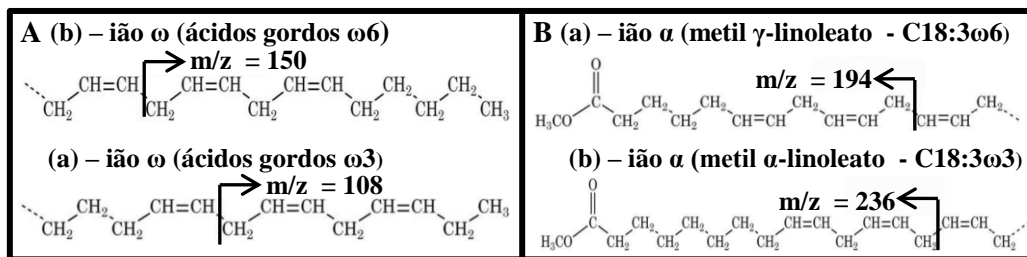


Figura 1.23. - A: Diagrama dos íões ω (a – ácidos gordos $\omega 6$; b – ácidos gordos $\omega 3$); B: Diagrama dos íões α (a – metil γ -linoleato (C18:3 $\omega 6$); b - metil α -linoleato (C18:3 $\omega 3$))

Para ácidos gordos polinsaturados, com mais de três ligações duplas, existem vários íões análogos (íões α) que permitem distinguir no espectro de massa os ácidos gordos insaturados a partir das posições das primeiras duas ligações duplas (Tabela 1.2.).

Tabela 1.2. - Íões α para as diferentes famílias de FAME no espectro de massa

Íões α de ácidos gordos polinsaturados no espectro de massa								
Primeiras duas ligações duplas	$\Delta 4,7$	$\Delta 5,8$	$\Delta 6,9$	$\Delta 7,10$	$\Delta 8,11$	$\Delta 9,12$	$\Delta 10,13$	$\Delta 11,14$
Ião (m/z)	166	180	194	208	222	236	250	264

Considerando o éster metílico do ácido gordo clupanodónico (C20:5 $\omega 3$) (Figura 1.24.), é possível visualizar pelo seu espectro de massa o pico molecular (m/z = 316), apesar de ser pouco intenso, e a série de hidrocarbonetos no espectro. O pico predominante no espectro (m/z = 79) é denominado por rearranjo de tropílio, composto aromático com fórmula empírica [C7H7]⁺. Deteta-se o fragmento m/z = 108 (ião ω) devido à posição das primeiras duas ligações duplas a partir do terminal metilo, e o fragmento m/z = 180 corresponde ao ião α .

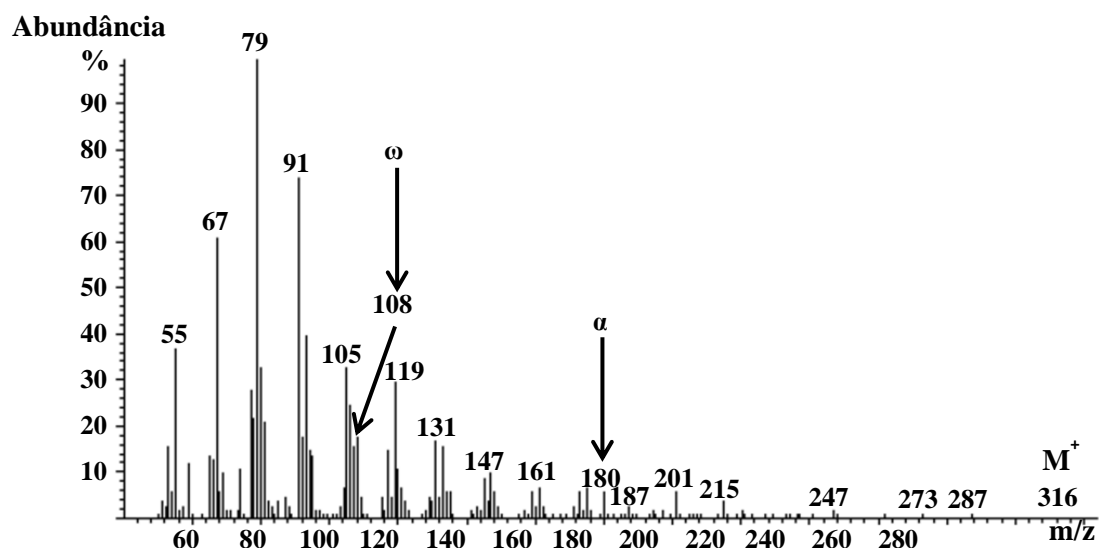


Figura 1.24. - Espectro de massa do éster metílico do ácido gordo clupanodónico (C20:5 ω 3)

1.4.3.1.4. Ácidos gordos ramificados

Para cada ácido gordo de cadeia ramificada existem dois fragmentos distintos (a e b) que se encontram em cada lado da ramificação, permitindo determinar a posição da ramificação na cadeia de hidrocarbonetos (Figura 1.25.).

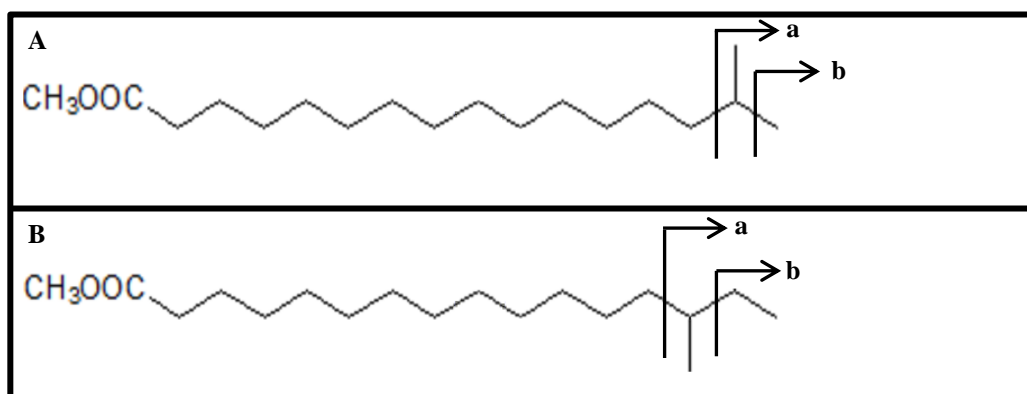


Figura 1.25. - Representação da fragmentação dos iões “a” e “b” para os ácidos gordos metil 15-metilhexadecanoato (A) e metil 14-metilhexadecanoato (B) respetivamente.

Para o isómero *iso* do éster metílico do ácido *iso*-hexadecanóico e o isómero *anteiso* do éster metílico do ácido *anteiso*-hexadecanóico (Figura 1.26. e Figura 1.27., respetivamente), é possível visualizar através dos espectros de massa que o pico predominante corresponde ao ião McLafferty ($m/z = 74$) e o pico molecular ($m/z = 284$). Existem iões significantes que permitem distinguir ambos os isómeros: como o ião $[M-15]^+$ ($m/z = 269$), o pico é ligeiramente superior para o isómero *iso*, e a presença de um grupo de iões $[M-31/32]^+$ ($m/z = 253/254$) para o mesmo isómero; O ião

$[M-29]^+$ ($m/z = 255$) é mais abundante que o equivalente ião $[M-31]^+$ para o isômero *anteiso*; É possível, por vezes, detetar o ião $[M-61]^+$ ($m/z = 223$) no isômero *anteiso*; Ambos os isômeros apresentam a perda do ião $[M-43]^+$ ($m/z = 241$); A detecção da perda dos iões $[M-43]^+$ ($m/z = 241$) e $[M-15]^+$ ($m/z = 269$), correspondentes aos fragmentos “a” e “b” respetivamente, no isômero *iso*; A detecção da perda dos iões $[M-57]^+$ ($m/z = 227$) e $[M-29]^+$ ($m/z = 255$), correspondentes aos fragmentos “a” e “b” respetivamente, no isômero *anteiso*.

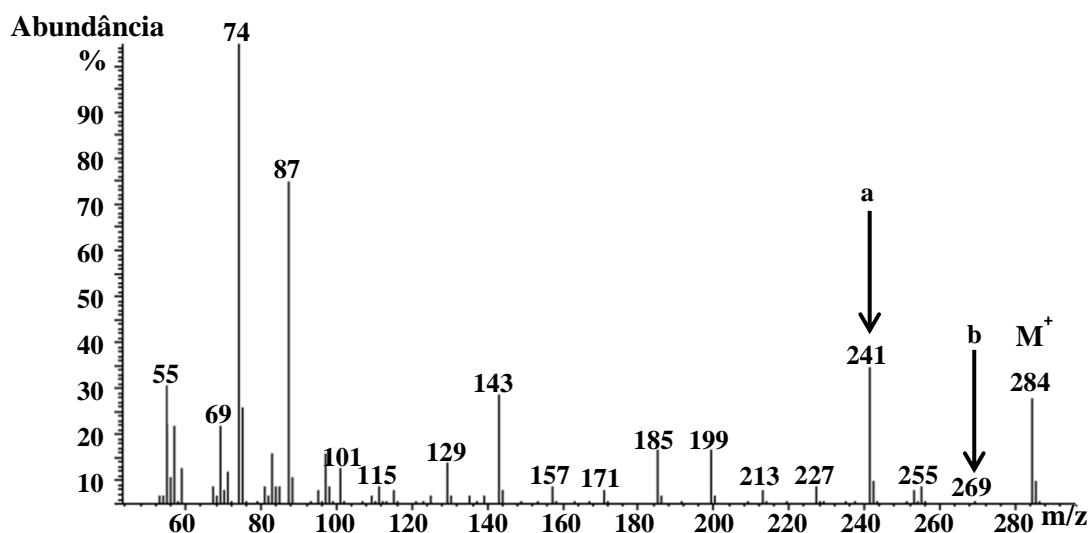


Figura 1.26. - Espectro de massa éster metílico do ácido iso-hexadecanóico (i-C16:0)

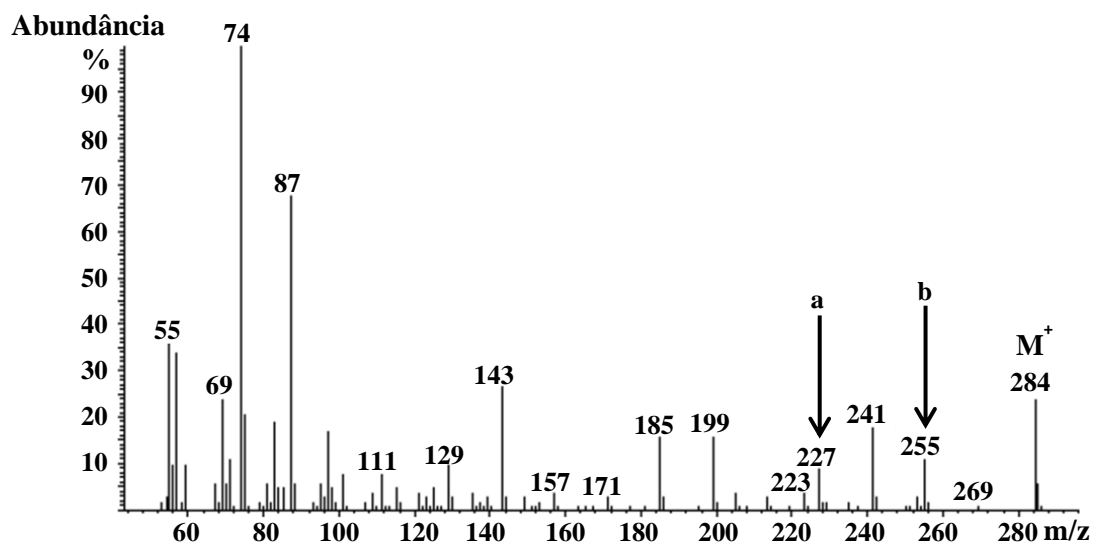


Figura 1.27. - Espectro de massa éster metílico do ácido anteiso-hexadecanóico (a-C16:0)

É possível encontrar na natureza ácidos gordos isoprenóides, moléculas com múltiplas ramificações. Dependendo da posição da primeira ramificação (grupo metilo) em relação ao carbono do terminal carboxílico, o pico base deixa de ser o ião McLafferty ($m/z = 74$) e o

fragmento base é composto também pela primeira ramificação. Ou seja, caso o grupo metilo ramificado se encontra no carbono 4 da cadeia de hidrocarbonetos, o pico base será o $m/z = 87$ (Figura 1.28.), caso a primeira ramificação se encontre ligado ao carbono 2 ou 3 o pico base será $m/z = 88$ e $m/z = 101$, respectivamente.

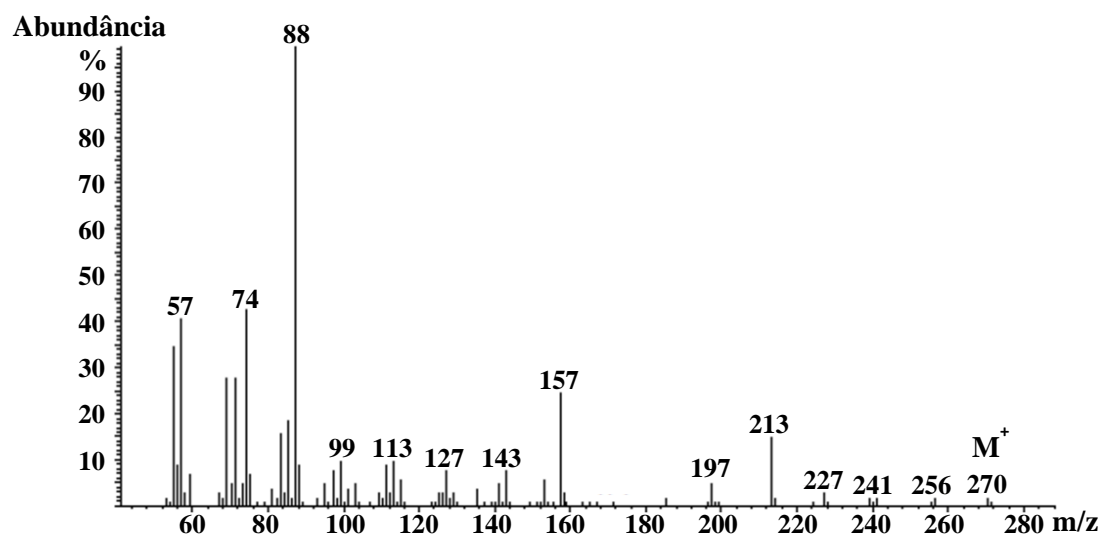


Figura 1.28. - Espectro de massa do éster metílico do ácido 4,8,12-metiltridecanóico

2. Metodologia

2.1. Local de captura, e obtenção de tecido muscular

A captura dos indivíduos na fase adulta ocorreu na bacia hidrográfica do Mondego (na Figueira da Foz (40° 7' 0'' N, 8° 54' 0'' W), durante o período da migração reprodutora (entre Janeiro e Abril). Estas foram realizadas por pescadores locais, recorrendo às artes tradicionais de pesca.

No decorrer do trabalho, foram capturados 15 animais por pescadores locais, tendo sido transportados vivos para o laboratório (Fluviário de Mora), onde se realizou a dissecação e determinação do género.

Relativamente à captura de indivíduos em fase larvar, esta decorreu no Rio Mondego, tendo sido realizada por captura com recurso a pesca elétrica. Os indivíduos capturados foram transportados vivos em tanques de capacidade 0.4m³ equipados com sistema apropriado de suporte de vida e mantidos em cativeiro nas instalações do Fluviário de Mora até processamento das amostras.

2.2. Determinação do género, dados biométricos e obtenção de tecido muscular

Para cada indivíduo adulto procedeu-se à determinação dos dados biométricos: massa corporal (g) e comprimento total (cm) medido entre a extremidade do disco oral e a extremidade da barbatana caudal. Em seguida, e após remoção da pele, foi extraída a amostra de músculo da proximidade da linha média dorsal, do flanco esquerdo do animal, junto à barbatana dorsal. As amostras foram então lavadas com uma solução de cloreto de sódio a 0.9 %. Procedeu-se à pesagem e envolveu-se em papel vegetal etiquetada e em sacos de plástico. Todas as amostras foram armazenadas na arca ultracongeladora, a -80 °C, até à sua posterior utilização. O género foi determinado mediante a observação das gónadas.

Para as lampreias-marinha em fase larvar o procedimento foi idêntico, tendo sido selecionados aleatoriamente 15 indivíduos de um total de 30.

2.3. Reagentes e padrões

Tabela 2.1. - Reagentes e padrões

Reagentes	Fórmula Química	Marca	Pureza
Metanol	CH ₃ OH	Merck	99,0 %
Clorofórmio	CH ₃ Cl	Merck	99,99 %
Hidroxitolueno butilado	BHT	Sigma-Aldrich	99,0 %
Terra de Diatomáceas	SiO ₂	Hydromatrix Varian	
Hidróxido de Sódio	NaOH	Merck	99,0 %
Trifluoreto de Boro/Metanol	BF ₃ /MeOH	Sigma-Aldrich	10 mg /mL
Éter de Petróleo	-	Merck	99,0 %
Hexano	C ₆ H ₁₄	J.T. Baker	99,99 %
Padrões		Marca	
37 FAME MIX 37		Supelco	10 mg/mL
26 BAME MIX 26		Supelco	10 mg/mL

2.4. Extração dos lípidos totais

Para a determinação dos lípidos totais presentes no músculo foram utilizadas amostras de músculo de 17 g e 5 g de lampreia-marinha na fase adulta e larvar respectivamente, procedeu-se à liofilização durante 48 horas, à temperatura de -45 °C, a uma pressão de 0.1 mbar.

Após a liofilização, as amostras foram trituradas com auxílio à picadora (Moulinex). A 200 mg (± 0.005 g) de amostra, adicionou-se 600 mg de agente inerte (Terra de Diatomáceas) e misturou-se com auxílio de um almofariz de porcelana. Esta mistura foi colocada numa célula de extração (ASE 100) (Figura 2.1.) Deste modo, cada célula de extração de 10 mL, colocaram-se dois filtros celulósicos (D28 30 mm, Thermo) na base juntamente com 600 mg de agente inerte. Finalmente aplicaram-se dois filtros celulósicos no topo da célula e esta foi colocada no ASE 100.



Figura 2.1. - Aparelho ASE (Accelerated Solvent Extractor) (Extraído de Ventura, 2014)

A extração dos lípidos totais do músculo decorreu segundo as condições indicadas na tabela 2.2.

Tabela 2.2. - Parâmetros programados no ASE

Parâmetros de Extração	Condições
Temperatura	100 °C
Pressão	13.8 Mpa
Solvente	Clorofórmio/Metanol (60:40 %) + BHT (100 mg/mL)
Nº de ciclos de extração estáticos	2
Tempo de ciclo	5 min
Purga das células	Azoto (60 s)

Após a extração, os lípidos totais foram transferidos para balões de fundo redondo de capacidade 50 mL, previamente tarados e identificados e procedeu-se à evaporação num evaporador rotativo (TurboVap, Zymark) à temperatura de 50 °C. Após a evaporação determinou-se a massa do resíduo seco, correspondente ao teor de lípidos totais e calculou-se a percentagem de lípidos totais segundo a equação:

$$\text{Lípidos Totais (\%)} = \frac{\text{Massa da Amostra Seca}}{\text{Massa da Amostra}} \times 100$$

Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos de metilação de capacidade 10 mL, previamente etiquetados, com recurso a 1 mL de clorofórmio. Após a transferência, as amostras foram secas em corrente de azoto.

2.5. Transesterificação dos lípidos totais

Cada amostra foi saponificada numa solução metanólica de 1 mL de hidróxido de sódio (0.5 N), a 70 °C, durante 15 min. Após a saponificação as amostras foram arrefecidas à temperatura ambiente.

Os ácidos gordos foram transesterificados com a adição de 1 mL de solução metanólica de trifluoreto de boro (14 g BF₃/MeOH) recentemente aberto, a 70 °C, durante 10 min, de acordo com o procedimento realizado por Morrison e Smith (1964). Em seguida deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e depois adicionaram-se 3 mL de água, procedeu-se à agitação para parar a reação de transesterificação e adicionou-se 1 mL de éter de petróleo. Os tubos foram agitados vigorosamente durante 2 min e deixados a repousar no frigorífico durante 12 h, à temperatura de 2 °C. Visualizou-se a separação de duas fases e recolheu-se a fase sobrenadante contendo os ésteres metílicos de ácidos gordos para *vials* de 2 mL previamente identificados, que foram

selados hermeticamente e armazenados na arca congeladora, à temperatura de -20 °C, para posterior análise cromatográfica.

2.6. Análise cromatográfica por GC/MS

As amostras foram analisadas por um sistema de cromatografia gasosa acoplado com espectrómetro de massa (GC-MS), sendo utilizado um cromatógrafo Bruker Scion TQ 456 GC-MS (Figura 2.2.) equipado com uma válvula de Dean-Valco VICI em T de aço de 1/32'' (diâmetro externo), 0.25 (diâmetro interno) VICI, Ag International, Schenkon, Suíça.

Foram utilizadas duas colunas capilares: DB-WAX (30 m x d.i. 0.25 mm x d_f 0.25 µm, Zebron) na primeira dimensão; DB-5 (30 m x d.i. 0.25 mm x d_f 0.25 µm, Zebron) na segunda dimensão; coluna desativada (30 m x d.i. 0,25 mm, Bruker). O gás de arraste utilizado foi o Hélio, a pressão constante de 35.0 psi no controlo eletrónico de fluxos 35.0 (EFC 21) e 23.0 Psi no EFC 24. Ambas as pressões ajustaram um fluxo constante de 2.0 mL/min e 1.9 mL/min respetivamente.



Figura 2.2. - Aparelho de GC-MS

O forno foi aquecido inicialmente a 120 °C, durante 5 min, em seguida procedeu-se a uma rampa de temperatura de 4 °C/min até aos 240 °C à qual se seguiu outra rampa a 1 °C/min, até aos 250 °C, mantendo-se durante 10 min (Figura 2.3.). O tempo resultante da análise cromatográfica foi 55 min. A temperatura do injetor foi mantida a 280 °C, com *split* inicial de 1:50, *split* 1:100 durante 1 min e *split* 1:10 durante 3 min. A temperatura de interface do detetor e da fonte de ionização foram de 240 °C e 220 °C, respetivamente. A análise dos picos e respetivos espectros

de massa foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV, com varrimento de $m/z = 40$ a 450. A obtenção dos dados foi realizada com a utilização do software MSWS 8.2.

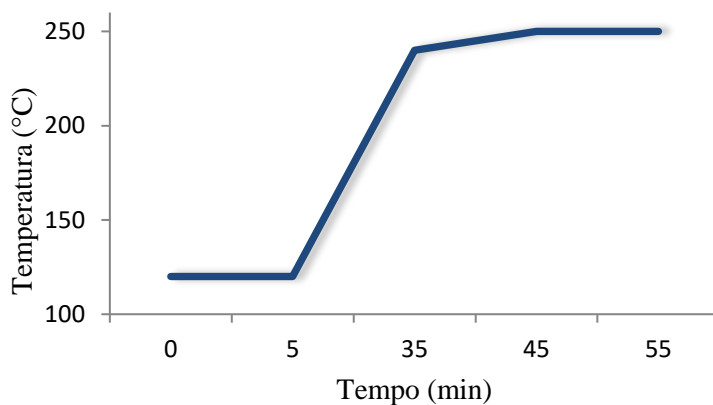


Figura 2.3. - Rampa de temperatura

Realizou-se a análise dos padrões externos FAME MIX 37 e BAME MIX 26 (10 mg/L em hexano) nas mesmas condições experimentais (Figura 3.4. e Figura 3.5.).

Todas as amostras de lampreias-marinha derivatizadas foram previamente diluídas numa razão 1:3 em hexano antes da análise cromatográfica, utilizando as mesmas condições experimentais descritas anteriormente.

2.7. Tratamento dos dados

Todos os valores obtidos da análise cromatográfica foram expressos em percentagem total de ácidos gordos identificados na amostra, de modo a eliminar possíveis efeitos de concentração de acordo com a equação:

$$\text{Área (\%)} = \frac{A_i}{\sum A} \times 100$$

Na qual:

A_i – área do pico do componente individual (i);

$\sum A$ – Somatório de todas as áreas dos picos identificados.

2.8. Determinação dos índices

Os resultados expressos em percentagem do total de ácidos gordos identificados na amostra foram utilizados para o cálculo dos somatórios dos principais tipos e famílias de ácidos gordos:

Cálculo do índice SFA:

$$SFA = C10:0 + C12:0 + C13:0 + C14:0 + C15:0 + C16:0 + C17:0 + C18:0 + C19:0 + C20:0 + C22:0$$

Cálculo do total de MUFA:

$$\Sigma MUFA = C14:1\omega9 + C14:1\omega8 + C14:1\omega5 + C15:1\omega9 + C15:1\omega8 + C16:1\omega9 + C16:1\omega8 + C17:1\omega9 + C17:1\omega7 + C18:1\omega9 + C20:1\omega9 + C20:1\omega7 + C24:1\omega9$$

Cálculo do total de PUFA:

$$\Sigma PUFA = C15:2\omega6 + C16:2\omega6 + C16:3\omega3 + C17:2\omega6 + C18:2\omega6 + C18:3\omega3 + C18:4\omega3 + C19:3\omega3 + C20:2\omega6 + C20:3\omega9 + C20:3\omega6 + C20:4\omega6 + C20:4\omega3 + C20:5\omega3 + C22:4\omega6 + C22:5\omega6 + C22:5\omega3 + C22:6\omega3$$

Cálculo do total de ácidos gordos ímpares:

$$\Sigma \text{Ímpares} = C13:0 + C15:0 + C15:1\omega9 + C15:1\omega8 + C15:2\omega6 + C17:0 + C17:\omega9 + C17:1\omega8 + C17:2\omega6 + C19:0 + C19:3\omega3$$

Cálculo do total de ácidos gordos na forma *iso*:

$$\Sigma i = i - C15:0 + i - C16:0 + i - C17:0 + i - C18:0$$

Cálculo do total de ácidos gordos na forma *anteiso*:

$$\Sigma a = a - C15:0 + a - C17:0 + a - C18:0$$

Cálculo do total de ómega 3:

$$\Sigma \omega3 = C16:3\omega3 + C18:3\omega3 + C18:4\omega3 + C19:3\omega3 + C20:4\omega3 + C20:5\omega3 + C22:5\omega3 + C22:6\omega3$$

Cálculo do total de ómega 5:

$$\Sigma \omega5 = C14:1\omega5$$

Cálculo do total de ómega 6:

$$\Sigma \omega6 = C15:2\omega6 + C16:2\omega6 + C17:2\omega6 + C18:2\omega6 + C18:3\omega6 + C20:2\omega6 + C20:3\omega6 + C20:4\omega6 + C22:4\omega6 + C22:5\omega6$$

Cálculo do total de ómega 7:

$$\Sigma\omega_7 = C16:1\omega_7 + C17:1\omega_7 + C20:1\omega_7$$

Cálculo do total de ómega 8:

$$\Sigma\omega_8 = C14:1\omega_8 + C15:1\omega_8$$

Cálculo do total de ómega 9:

$$\Sigma\omega_9 = C14:1\omega_9 + C15:1\omega_9 + C16:1\omega_9 + C17:1\omega_9 + C18:1\omega_9 + C20:1\omega_9 + C20:3\omega_9 + C24:1\omega_9$$

Para o cálculo do índice ω_3/ω_6 utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\frac{\omega_3}{\omega_6} = \frac{C16:3\omega_3 + C18:3\omega_3 + C18:4\omega_3 + C19:3\omega_3 + C20:4\omega_3 + 20:5\omega_3 + C22:5\omega_3 + C22:6\omega_3}{C15:2\omega_6 + C16:2\omega_6 + C17:2\omega_6 + C18:2\omega_6 + C18:3\omega_6 + C20:2\omega_6 + C20:3\omega_6 + C20:4\omega_6 + C11:5\omega_6}$$

2.9. Análise estatística dos dados

Foi realizada uma análise de modelo geral linear designada nos programas estatísticos por GLM, para testar se as variáveis dependentes diferiam entre a fase larvar e a fase adulta de lampreia-marinha mediante o uso de um fator fixo: fase do ciclo de vida. Deste modo, as variáveis utilizadas dividem a população em grupos e permite testar a hipótese nula (H_0) lampreia-marinha em fase de ciclo de vida distinta apresentam a mesma caracterização em termos de perfil em ácidos gordos. O nível de significância (*p-value*) adotado para os testes estatísticos efetuados foi de 0.05.

Para o tratamento de dados e análise estatística utilizou-se o pacote estatístico para Windows do programa “SPSS Statistics” versão 23.0 (IBM, E.U.A.).

3. Resultados e Discussão

3.1. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho baseia-se na caracterização do perfil lipídico do músculo de lampreia-marinha *Petromyzon marinus* para inferir a existência de um perfil de ácidos gordos que permaneça estável ao longo do ciclo de vida e que permita a distinção da fase adulta e fase larvar.

Aplicação de uma metodologia de análise cromatográfica por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa que permita a determinação da estrutura e classificação dos ácidos gordos presentes no perfil lipídico da lampreia-marinha.

3.2. Parâmetros Biométricos

Foi selecionado aleatoriamente uma amostra de 15 larvas e determinado para cada indivíduo a massa corporal total (g), comprimento total (cm) e peso total liofilizado (g) após extração lipídica.

No presente trabalho foram utilizados 30 animais sendo 15 representantes da fase adulta e os 15 representantes da fase larval do ciclo de vida de lampreia-marinha (Tabela 3.1.).

Tabela 3.1. - Parâmetros biométricos da lampreia-marinha da bacia hidrográfica do rio Mondego

Lampreia-marinha em fase adulta (n = 15)			Lampreia-marinha em fase larvar (n = 15)	
Massa corporal Total (g)	Comprimento Total (cm)	Género	Massa corporal Total (g)	Comprimento Total (cm)
1356	88.0	F	5.76	10.2
1449	94.5	M	4.99	10.4
1233	89.0	M	5.55	10.2
1508	91.5	F	5.31	10.7
1382	89.0	M	5.30	10.2
1460	94.5	M	4.40	10.5
1355	89.0	M	4.63	9.6
953	79.0	F	5.23	10.5
1416	90.5	M	6.06	11.2
1246	87.0	M	4.20	9.5
1356	91.0	M	5.35	10.7
1217	92.0	M	5.65	9.8
1368	92.0	M	4.49	9.7
1073	81.0	M	4.70	10.1
1668	96.0	F	4.11	10.1
Média ± SD		M/F	Média ± SD	
1336.0 ± 174.7	89.6 ± 4.7	2.8	5.23 ± 0.60	10.2 ± 0.45

Verificou-se uma correlação positiva e significativa ($p = 0.001$) entre o comprimento total e a massa corporal total para os indivíduos no estado adulto (Figura 3.1.).

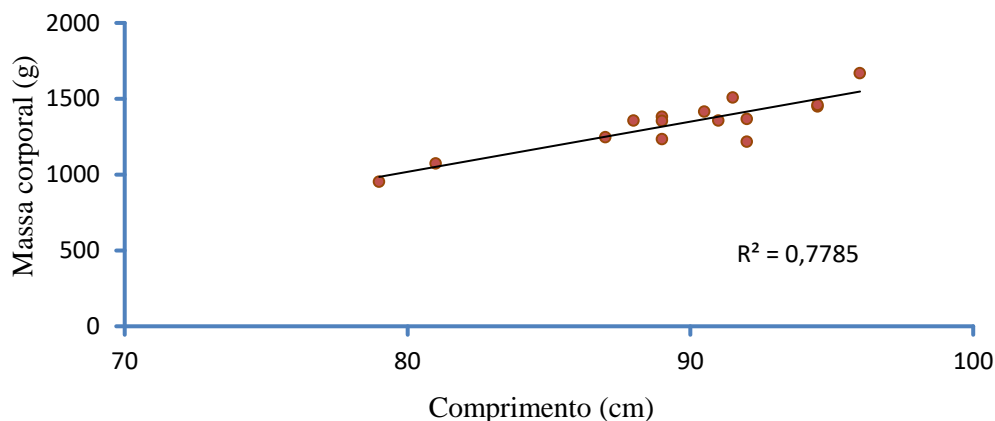


Figura 3.1. - Relação entre o comprimento total e a massa corporal total de adulto de lampreia-marinha

Em relação aos indivíduos em fase larvar verificou-se igualmente uma correlação positiva e significativa ($p = 0.05$) entre a massa corporal total e o comprimento total (Figura 3.2.).

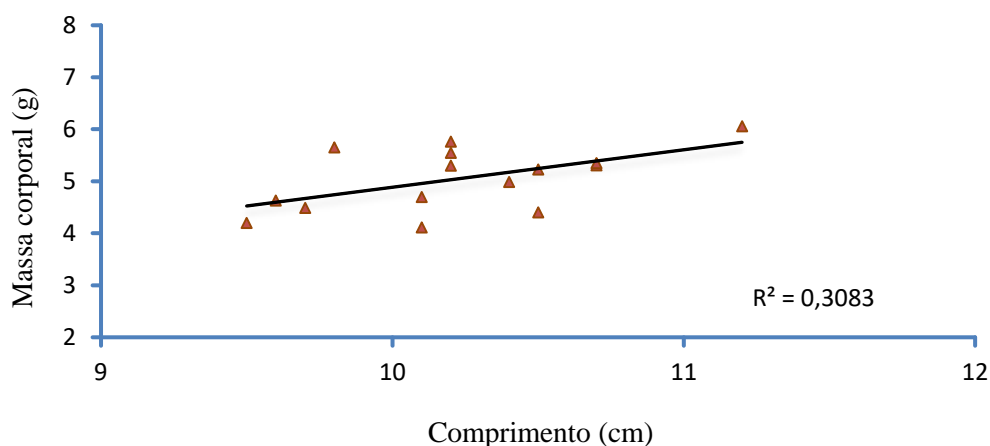


Figura 3.2. - Relação entre o comprimento e a massa corporal para indivíduos em fase larvar de lampreia-marinha

O valor médio referente à massa corporal total para os adultos foi de 1336 g, com o valor mais elevado observado correspondente a 1668 g e o valor mais baixo de 956 g. Os resultados obtidos estão em concordância com os valores já observados por Duarte *et al.* (2003) e Machado (2010), os quais referem um valor médio entre 1077 e os 1334 g na mesma fase do ciclo de vida.

Relativamente aos resultados obtidos nos indivíduos de fase larvar, a massa corporal total média foi 5.23 g, com um valor máximo de 6.06 g e um mínimo de 4.11 g. Estes valores são ligeiramente inferiores aos resultados obtidos por Swink and Johnson (2014), que mencionam um valor médio entre 5.33 e 6.01 g.

Em relação ao comprimento total na fase adulta obteve-se um valor médio de 89.6 cm, em concordância com os valores obtidos por Machado (2010) para lampreias-marinha capturadas na bacia hidrográfica do rio Mondego (88.2 cm).

O comprimento médio total observado para as larvas de lampreia-marinha foi de 10.2 cm, sendo inferior aos valores obtidos por Almeida (2008) (16.1 cm).

Em relação à identificação do género, esta apenas foi feita para os indivíduos em fase adulta uma vez que a identificação é particularmente complicada para indivíduos com comprimento total inferior a 105 mm (Hardisty 1960).

Na tabela 3.2., encontram-se apresentados os resultados obtidos para a composição do músculo dos indivíduos na fase adulta e larvar em lípidos totais (expressos em g/ 100 g de matéria seca, M.S.).

Tabela 3.2. - Composição de lípidos totais por 100 g de matéria seca de músculo de lampreia-marinha

Lípidos (g/100 g)	
Fase adulta	Fase Larvar
56.5	44.9
56.9	46.5
63.4	44.3
68.1	27.9
66.0	45.0
75.1	20.9
73.7	38.9
60.7	42.5
63.3	57.7
67.6	28.6
57.7	51.7
62.4	29.7
58.4	43.7
63.5	52.5
70.9	41.5

A percentagem dos lípidos totais do músculo apresentou diferenças significativas ($p < 0.005$) entre os indivíduos das duas fases do ciclo de vida da lampreia-marinha, sendo os valores médio de 62.3 g/100 g (fase adulta) e de 41.2 g/100 g (fase larvar).

3.3. Otimização da análise cromatográfica para os ácidos gordos na matriz de músculo de lampreia-marinha

Sendo um dos objetivos deste trabalho testar condições experimentais de análise cromatográfica adequadas à exploração eficiente do perfil em ácidos gordos numa matriz complexa de musculatura de lampreia-marinha. Foram testados ensaios de otimização quer a fluxo constante quer a pressão constante.

Durante o processo de otimização verificou-se que a análise em presença de fluxos contantes relativamente à análise a pressões contantes (Figura 3.3.) se traduziu na obtenção de picos cromatográficos de maior resolução quando em presença de igual rampa de temperatura.

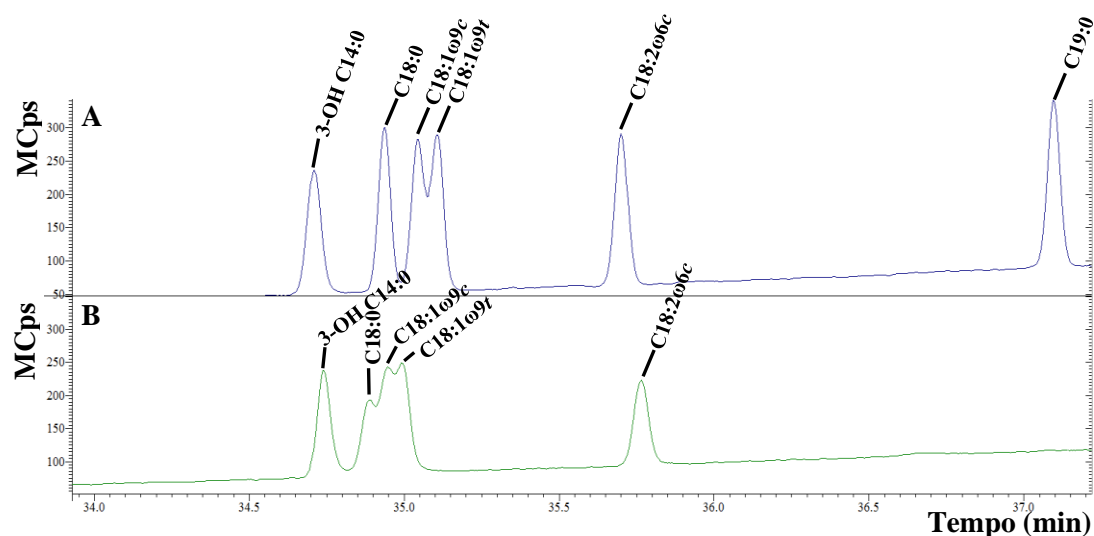


Figura 3.3. - Análise cromatográfica da amostra padrão BAME MIX 26 a fluxos constantes (A) e a pressões constantes (B)

A resolução dos picos cromatográficos é superior numa análise a fluxos constantes uma vez que a velocidade linear se mantém parcialmente inalterada durante toda a corrida. Para análises a pressões constantes, a velocidade linear aumenta com o tempo de corrida, aumentando também a co-eluição de picos cromatográficos.

Foram testadas diferentes rampas de temperatura, tendo-se concluído que a mais adequada para uma boa resolução de separação de ácidos gordos tinha início a 120 °C e alcançava a temperatura máxima de 250 °C (Figura 2.3.).

Após o estabelecimento das condições experimentais ótimas para uma boa separação dos ésteres metílicos de ácidos gordos, procedeu-se à identificação dos ácidos gordos presentes nos dois padrões comerciais utilizados neste trabalho, FAME MIX 37 e BAME MIX 26 (10mg/L em hexano), recorrendo aos seus tempos de retenção e respetivos espectros de massa (Figura 3.4. e Figura 3.5.).

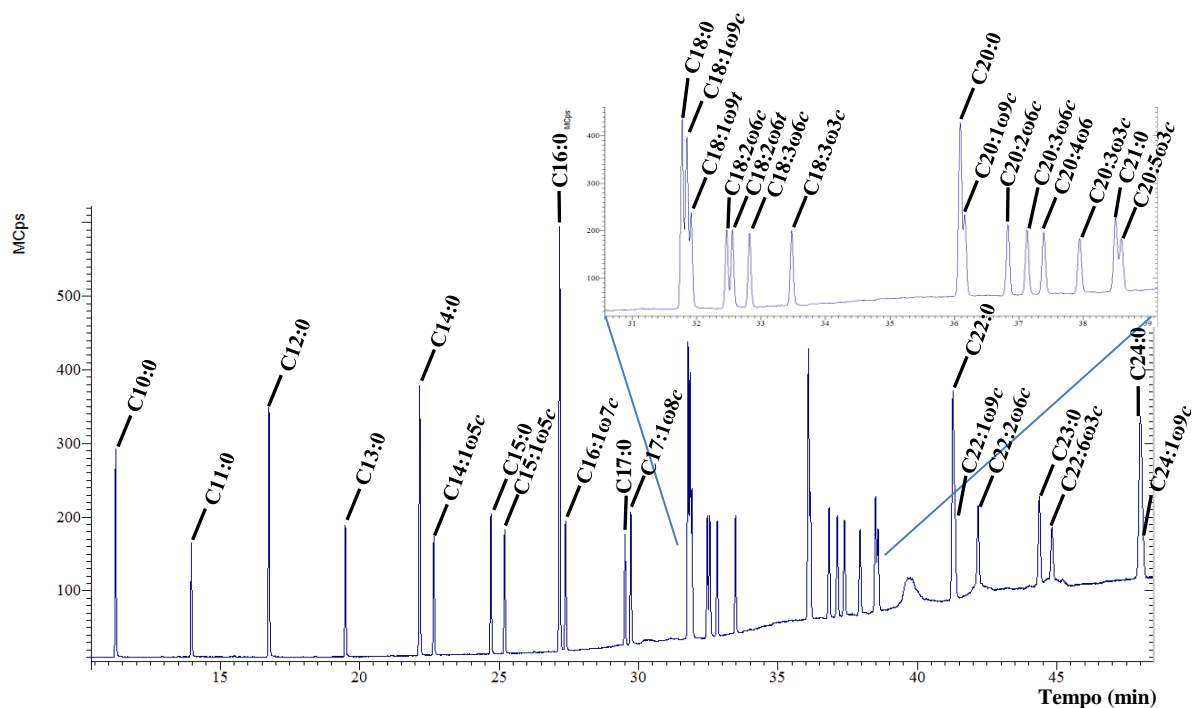


Figura 3.4. - Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos gordos do padrão externo FAME MIX 37

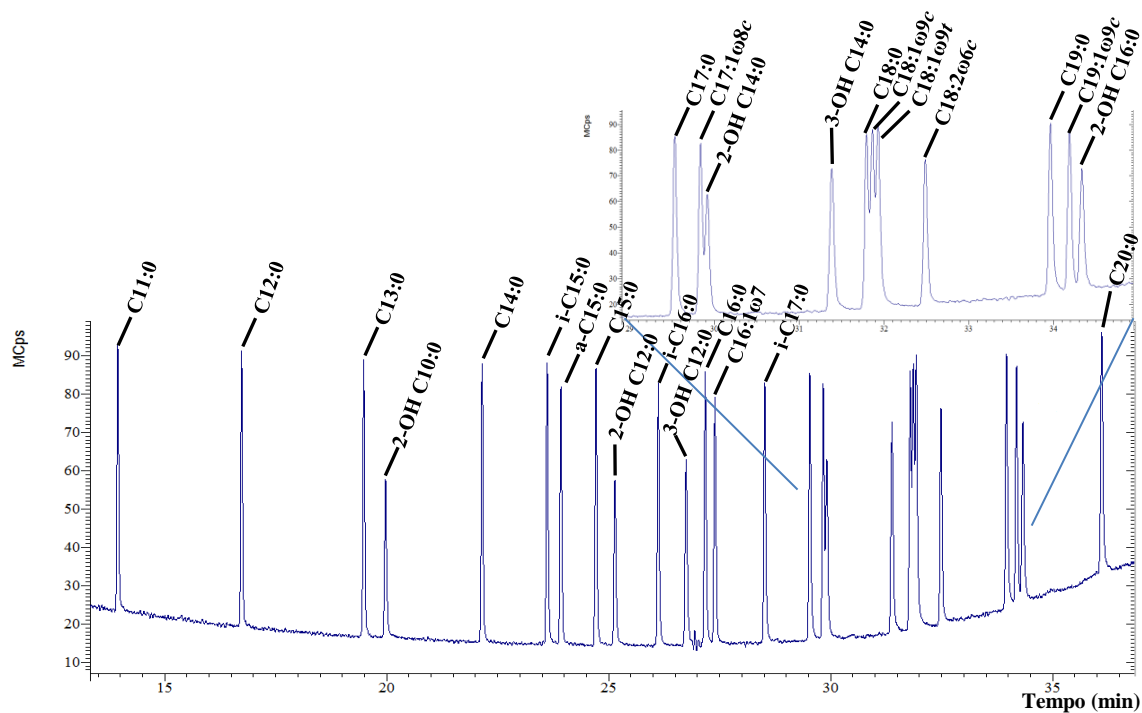


Figura 3.5. - Cromatograma dos ésteres metílicos dos ácidos gordos do padrão externo BAME MIX 26

Na tabela 3.3. encontram-se os tempos de retenção e os fragmentos de iões predominantes identificados para cada ácido gordo esterificado, presentes no padrão FAME MIX 37 e BAME MIX 26.

Tabela 3.3. - Tempos de retenção e fragmentos de iões predominantes para a identificação dos ácidos gordos esterificados em estudo

FAME + BAME MIX			
Nomenclatura IUPAC	Simbologia	Tempo de Retenção (min)	Fragmentos de iões principais (m/z)
Éster metílico do ácido cáprico	C10:0	11.528	74* - 87 - 43 - 186**
Éster metílico do ácido undecanóico	C11:0	14.288	74* - 87 - 43 - 200**
Éster metílico do ácido dodecanóico	C12:0	17.099	74* - 87 - 43 - 214**
Éster metílico do ácido tridecanóico	C13:0	19.863	74* - 87 - 43 - 228**
Éster metílico do ácido 2-hidroxidodecanóico	2-OH-C10:0	20.409	69* - 55 - 83 - 202**
Éster metílico do ácido tetradecanóico	C14:0	22.543	74* - 87 - 43 - 242**
Éster metílico do ácido <i>cis</i> -9-tetradecenóico	C14:1 ω 5 <i>c</i>	23.068	55* - 74 - 69 - 240**
Éster metílico do ácido <i>iso</i> -pentadecanóico	i-C15:0	24.006	74* - 87 - 55 - 256**
Éster metílico do ácido <i>anteiso</i> -pentadecanóico	a-C15:0	24.324	74* - 87 - 55 - 256**
Éster metílico do ácido pentadecanóico	C15:0	25.112	74* - 87 - 43 - 256**
Éster metílico do ácido 2-hidroxidodecanóico	2-OH-C12:0	25.551	43* - 55 - 69 - 230**
Éster metílico do ácido <i>cis</i> -10-pentadecenóico	C15:1 ω 5 <i>c</i>	25.611	55* - 74 - 69 - 254**
Éster metílico do ácido <i>iso</i> -hexadecanóico	i-C16:0	26.522	74* - 87 - 55 - 256**
Éster metílico do ácido 3-hidroxidodecanóico	3-OH-C12:0	27.195	103* - 43 - 71 - 230**
Éster metílico do ácido hexadecanóico	C16:0	27.582	74* - 87 - 43 - 270**
Éster metílico do ácido <i>cis</i> -9-hexadecenóico	C16:1 ω 7 <i>c</i>	27.812	55* - 41 - 69 - 268**
Éster metílico do ácido <i>iso</i> -heptadecanóico	i-C17:0	28.925	74* - 87 - 43 - 284**
Éster metílico do ácido heptadecanóico	C17:0	29.942	74* - 87 - 43 - 284**
Éster metílico do ácido <i>cis</i> -9-heptadecenóico	C17:1 ω 8 <i>c</i>	30.164	55* - 69 - 74 - 282**
Éster metílico do ácido <i>cis</i> -10-heptadecenóico	C17:1 ω 7 <i>c</i>	30.262	55* - 69 - 74 - 282**
Éster metílico do ácido 2-hidroxitetradecanóico	2-OH-C14:0	30.372	69* - 55 - 41 - 258**
Éster metílico do ácido 3-hidroxitetradecanóico	3-OH-C14:0	31.839	103* - 43 - 74 - 258**
Éster metílico do ácido octadecanóico	C18:0	32.212	74* - 87 - 43 - 298**
Éster metílico do ácido <i>cis</i> -9-octadecenóico	C18:1 ω 9 <i>c</i>	32.294	55* - 41 - 69 - 296**
Éster metílico do ácido <i>trans</i> -9-octadecenóico	C18:1 ω 9 <i>t</i>	32.358	55* - 41 - 69 - 296**
Éster metílico do ácido <i>cis</i> -9,12-octadecadienóico	C18:2 ω 6 <i>c</i>	32.924	67* - 81 - 55 - 294**
Éster metílico do ácido <i>trans</i> -9,12-octadecadienóico	C18:2 ω 6 <i>t</i>	33.013	67* - 81 - 55 - 294**
Éster metílico do ácido <i>cis</i> -6,9,12-octadecatrienóico	C18:3 ω 6 <i>c</i>	33.291	79* - 67 - 41 - 292**
Éster metílico do ácido <i>cis</i> -9,12,15-octadecatrienóico	C18:3 ω 3 <i>c</i>	33.951	79* - 67 - 41 - 292**
Éster metílico do ácido nonadecanóico	C19:0	34.387	74* - 87 - 43 - 312**
Éster metílico do ácido <i>cis</i> -10-nonadecenóico	C19:1 ω 9 <i>c</i>	34.627	55* - 41 - 69 - 310**
Éster metílico do ácido 2-hidroxihexadecanóico	2-OH-C16:0	34.798	55* - 69 - 43 - 286**
Éster metílico do ácido eicosanóico	C20:0	36.592	74* - 87 - 43 - 326**
Éster metílico do ácido <i>cis</i> -11-eicosenóico	C20:1 ω 9 <i>c</i>	36.677	55* - 69 - 41 - 324**
Éster metílico do ácido <i>cis</i> -11,14-eicosadienóico	C20:2 ω 6 <i>c</i>	37.379	67* - 81 - 55 - 322**
Éster metílico do ácido <i>cis</i> -8,11,14-eicosatrienóico	C20:3 ω 6 <i>c</i>	37.691	79* - 67 - 41 - 320**
Éster metílico do ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico	C20:4 ω 6	37.964	79* - 67 - 91 - 318**
Éster metílico do ácido <i>cis</i> -11,14,17-eicosatrienóico	C20:3 ω 3 <i>c</i>	38.535	79* - 67 - 41 - 320**
Éster metílico do ácido heneicosanóico	C21:0	39.097	74* - 87 - 43 - 340**

Éster metílico do ácido <i>cis</i> -5,8,11,14,17-eicosopentaenóico	C20:5 ω 3 <i>c</i>	39.220	79* - 91 - 67 - 316**
Éster metílico do ácido docosanóico	C22:0	41.963	74* - 87 - 43 - 354**
Éster metílico do ácido 11-eicosenóico	C22:1 ω 9 <i>c</i>	42.027	55* - 69 - 41 - 352**
Éster metílico do ácido <i>cis</i> -13,16-docosadienóico	C22:2 ω 6 <i>c</i>	42.904	67* - 81 - 55 - 350**
Éster metílico do ácido tricosanóico	C23:0	45.169	74* - 87 - 43 - 368**
Éster metílico do ácido <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico	C22:6 ω 3 <i>c</i>	45.690	79* - 91 - 67 - 342**
Éster metílico do ácido tetracosanóico	C24:0	48.992	74* - 87 - 43 - 382**
Éster metílico do ácido <i>cis</i> -15-tetracosenóico	C24:1 ω 9 <i>c</i>	49.060	55* - 69 - 43 - 380**

* - Pico predominante; ** - pico molecular

As mesmas condições experimentais foram aplicadas para as amostras de lampreia-marinha *Petromyzon marinus* na fase adulta e na fase larvar.

3.4. Caraterização do perfil em ácidos gordos do músculo de lampreia-marinha (fase adulta)

Na tabela 3.4. encontra-se o perfil em ácidos gordos dos lípidos totais do músculo de lampreia-marinha em fase adulta

Tabela 3.4. - Perfil dos ácidos gordos (média \pm desvio padrão, expresso em percentagem relativa ao total de ácidos gordos identificados) do músculo de lampreia-marinha adulta. SFA – ácidos gordos saturados; MUFA – ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – ácidos gordos polinsaturados; i – *iso*; a – *anteiso*; Ímpares – ácidos gordos com número de insaturações ímpar.

Ácidos Gordos	Fase adulta (n = 15)
C10:0	0.031 \pm 0.007
C12:0	2.902 \pm 0.687
C13:0	0.062 \pm 0.030
C14:0	22.496 \pm 2.149
C15:0	0.122 \pm 0.103
C16:0	20.772 \pm 1.907
C17:0	0.033 \pm 0.025
C18:0	2.213 \pm 0.347
C19:0	0.036 \pm 0.016
C20:0	0.214 \pm 0.030
ΣSFA	48.84
C14:1ω9	0.028 \pm 0.010
C14:1ω8	0.003 \pm 0.002
C14:1ω5	0.945 \pm 0.304
C15:1ω9	0.005 \pm 0.003
C15:1ω8	0.007 \pm 0.007
C16:1ω9	0.118 \pm 0.062
C16:1ω7	34.130 \pm 1.298
C17:1ω9	0.105 \pm 0.072
C18:1ω9 <i>c</i>	4.832 \pm 2.020
C18:1ω9 <i>t</i>	7.336 \pm 1.544
C20:1ω9	0.179 \pm 0.057

C20:1 ω 7	0.012 \pm 0.008
C24:1 ω 9	0.016 \pm 0.016
ΣMUFA	47.716
C18:2 ω 6c	0.140 \pm 0.053
C18:3 ω 3t	0.038 \pm 0.024
C20:2 ω 6	0.173 \pm 0.053
C20:3 ω 9	0.082 \pm 0.046
C20:3 ω 6t	0.017 \pm 0.012
C20:4 ω 6	0.377 \pm 0.059
C20:4 ω 3	0.107 \pm 0.058
C20:5 ω 3	0.804 \pm 0.241
C22:4 ω 6	0.026 \pm 0.020
C22:5 ω 6	0.059 \pm 0.080
C22:5 ω 3	0.611 \pm 0.152
C22:6 ω 3	0.894 \pm 0.408
ΣPUFA	3.33
i-C15:0	0.006 \pm 0.006
i-C16:0	0.006 \pm 0.005
i-C17:0	0.026 \pm 0.007
i-C18:0	0.023 \pm 0.013
Σi	0.062
a-C15:0	0.014 \pm 0.008
a-C17:0	0.010 \pm 0.006
a-C18:0	0.028 \pm 0.024
Σa	0.052
ΣÍmpares	0.323
$\Sigma\omega$3	2.455
$\Sigma\omega$5	0.945
$\Sigma\omega$6	0.793
$\Sigma\omega$7	34.142
$\Sigma\omega$8	0.01
$\Sigma\omega$9	12.798
$\Sigma\omega$3/ω6	3.09

Pela análise da tabela 3.4. verifica-se, em percentagem média dos ácidos gordos totais, uma predominância dos ácidos gordos saturados (48.8 %) e moninsaturados (47.7 %) relativamente aos ácidos gordos polinsaturados (3.3 %). Esta distribuição do perfil de ácidos gordos dos lípidos totais do músculo é característica para diversas espécies de peixes classificados como gordos, e comprova que as reservas lipídicas da maioria das espécies de peixe são compostas maioritariamente pela acumulação de SFA e MUFA (Kozlova & Klotimchenko, 2011; Pinela *et. al.*, 2009).

Apesar de existirem em pequenas quantidades, verifica-se a presença de vários ácidos gordos incomuns como o ácido tridecílico (C13:0), pentadecílico (C15:0), margárico (C17:0) e o ácido 9-heptadecenóico (C17:1 ω 9). Os ácidos gordos de cadeia ímpar estão presentes em todos os

animais onde o esqueleto de aminoácidos muda o primeiro acetato na biossíntese de ácidos gordos (Ackman, 1999).

Para os ácidos gordos saturados verifica-se uma predominância do ácido mirístico (C14:0) com 46.1 % e do ácido palmítico (C16:0) com 42.5 %. A percentagem elevada do ácido palmítico é expectável por ser uma fonte potencial de energia metabólica, utilizada durante a fase migratória e no desenvolvimento das gónadas das fêmeas (Henderson *et al.*, 1984), verificando-se que a percentagem média de ácido palmítico em fêmeas é ligeiramente superior em comparação com a dos machos (21.7 % e 20.6 %, respetivamente). Por oposição, a percentagem média mais reduzida corresponde ao ácido láurico (C12:0) com 5.9 % e ao ácido esteárico (C18:0) com 4.5 %.

Para os ácidos gordos monoinsaturados, o predominante é o ácido palmitoléico (C16:1 ω 7) seguido do ácido oleico (C18:1 ω 9) com valores de 71.5 % e 25.5 % respetivamente do total de MUFA. Para peixes marinhos o ácido oleico é um dos ácidos predominantes, correspondendo a 60 a 75 % do total de MUFA, justificando a sua importância na medida em que a par com o ácido palmítico é uma fonte de energia metabólica para os peixes em fase de migração reprodutiva (Henderson *et al.*, 1984).

Relativamente aos ácidos gordos polinsaturados, verifica-se uma superioridade de ácido docosahexaenóico (C22:6 ω 3, DHA) e do ácido eicosapentaenóico (C20:5 ω 3, EPA) representando 26.8 % e 24.1 % do total de PUFA, respetivamente. Os teores elevados de DHA e EPA em comparação com os restantes PUFA são de esperar, uma vez que estão envolvidos no crescimento e desenvolvimento, incluindo a reprodução, e na estrutura e função das membranas celulares (Cejas *et al.*, 2004). Tanto o DHA como o EPA pertencem à família ω 3 representando respetivamente 36.4 % e 32.7 % do total de ω 3, esta superioridade do DHA em relação ao EPA durante a fase migratória é descrita noutros estudos realizados por Özogul *et al.*, (2007), Afonso (2009), Özogul *et al.*, (2011) e Prato & Biandolino (2012), podendo ser explicada pela possível oxidação seletiva do EPA, conduzindo assim a uma retenção seletiva de DHA. (Tocher, 2003).

Verifica-se que a família ω 7 é predominante em relação às restantes famílias ómega correspondendo a 34.1 % dos ácidos gordos totais presentes no músculo de lampreia-marinha sendo o ácido palmitoléico, o ácido gordo predominante da família ω 7 (99.96%). A família ω 9 corresponde a 12.8 % dos ácidos gordos totais, da qual o ácido predominante corresponde ao ácido oleico (95.1 %). Em relação à família ω 6, correspondendo a 0.8 % dos ácidos gordos totais, o ácido araquidónico (C20:4 ω 6, AA) foi o ácido predominante da família correspondendo a 47.5 % do total de ω 6, seguido do ácido eicosadienóico (C20:2 ω 6) e ácido linoleico (18:2 ω 6, LA) correspondendo respetivamente a 21.8 % e 17.6 % do total de ω 6. As famílias ω 5 e ω 8 encontram-se em pequena percentagem relativamente às restantes famílias ómega, correspondendo respetivamente a 0.9 % e 0.01 %.

A razão entre o somatório dos ácidos gordos da família ω 3 e ω 6 apresenta percentagem superior a 1 (3.1 %) o que demonstra uma predominância da família ω 3, maioritariamente DHA e EPA, relativamente à família ω 6. Apesar de ser expectável a predominância da família ω 3, os resultados

encontram-se abaixo do intervalo de valores referenciados (4.7 % e 14.4 %) para espécies marinhas (Henderson & Tocher, 1987; Steffens, 1997; Parrish, 2009).

Existe uma pequena percentagem de ácidos gordos ramificados presentes no músculo de lampreia-marinha adulta, mas verifica-se a presença de ácidos gordos sob a forma *iso* e *anteiso*, correspondendo respetivamente a 0.06 % e 0.05 % dos ácidos gordos totais.

3.5. Caraterização do perfil em ácidos gordos do músculo de lampreia-marinha (fase larvar)

Na tabela 3.5. encontra-se o perfil dos ácidos gordos dos lípidos totais de lampreia-marinha em fase larvar.

Tabela 3.5. - Perfil dos ácidos gordos (média \pm desvio padrão, expresso em percentagem relativa ao total de ácidos gordos identificados) de lampreia-marinha em fase larvar. SFA – ácidos gordos saturados; MUFA – ácidos gordos monoinsaturados; PUFA – ácidos gordos polinsaturados; i – *iso*; a – *anteiso*; Ímpares – ácidos gordos com número de insaturações ímpar

Ácidos Gordos	Lampreias-marinha em fase larvar (n = 15)
C10:0	0.078 \pm 0.021
C11:0	0.151 \pm 0.037
C12:0	4.926 \pm 1.062
C13:0	3.299 \pm 0.690
C14:0	21.796 \pm 3.415
C15:0	6.187 \pm 1.348
C16:0	12.265 \pm 4.510
C17:0	1.064 \pm 0.383
C18:0	1.621 \pm 0.455
C20:0	0.146 \pm 0.039
C22:0	0.028 \pm 0.016
ΣSFA	51.56
C14:1 ω 9	0.072 \pm 0.028
C14:1 ω 8	0.019 \pm 0.008
C14:1 ω 5	2.949 \pm 1.489
C15:1 ω 9	0.064 \pm 0.023
C15:1 ω 8	1.053 \pm 0.227
C16:1 ω 9	0.176 \pm 0.077
C16:1 ω 7	19.821 \pm 2.272
C17:1 ω 9	3.653 \pm 0.902
C17:1 ω 7	0.137 \pm 0.047
C18:1 ω 9 c	2.603 \pm 0.806
C18:1 ω 9 t	4.083 \pm 1.009
C20:1 ω 9	0.046 \pm 0.013
C20:1 ω 7	0.051 \pm 0.017
ΣMUFA	34.725
C15:2 ω 6	0.041 \pm 0.016
C16:2 ω 6	0.036 \pm 0.009
C16:3 ω 3	0.019 \pm 0.010
C17:2 ω 6	0.046 \pm 0.018
C18:2 ω 6 c	0.864 \pm 0.315
C18:3 ω 6	0.103 \pm 0.051
C18:3 ω 3c	0.203 \pm 0.121
C18:3 ω 3t	1.084 \pm 0.555

C18:4 ω 3	0.239 \pm 0.124
C19:3 ω 3	0.054 \pm 0.017
C20:2 ω 6	0.344 \pm 0.107
C20:3 ω 9	0.196 \pm 0.051
C20:3 ω 6t	0.246 \pm 0.100
C20:4 ω 6	1.173 \pm 0.503
C20:4 ω 3	0.432 \pm 0.194
C20:5 ω 3	2.583 \pm 1.228
C22:4 ω 6	0.128 \pm 0.050
C22:5 ω 6	0.315 \pm 0.134
C22:5 ω 3	1.096 \pm 0.424
C22:6 ω 3	1.109 \pm 0.526
ΣPUFA	10.312
i-C13:0	0.008 \pm 0.008
i-C14:0	0.003 \pm 0.003
i-C15:0	1.288 \pm 0.798
i-C16:0	0.029 \pm 0.010
i-C17:0	0.368 \pm 0.122
i-C18:0	0.017 \pm 0.007
Σi	1.714
a-C12:0	0.015 \pm 0.012
a-C13:0	0.040 \pm 0.025
a-C14:0	0.191 \pm 0.073
a-C15:0	0.576 \pm 0.193
a-C16:0	0.291 \pm 0.104
a-C17:0	0.503 \pm 0.154
3a-C16:0	0.035 \pm 0.022
a-C18:0	0.038 \pm 0.017
Σa	1.654
ΣÍmpares	15.748
$\Sigma\omega$3	6.818
$\Sigma\omega$5	2.949
$\Sigma\omega$6	3.297
$\Sigma\omega$7	20.009
$\Sigma\omega$8	1.072
$\Sigma\omega$9	10.892
$\Sigma\omega$3/ω6	2.065

Com base nos resultados obtidos da análise dos ácidos gordos de indivíduos em fase larvar (tabela 3.5.) verifica-se uma predominância, expressa em percentagem média total de ácidos gordos, dos ácidos gordos saturados (51.6 %) seguidos dos ácidos moninsaturados (34.7 %) comparativamente aos ácidos gordos polinsaturados (10.3 %).

Para ácidos gordos de cadeia de hidrocarbonetos ímpar verifica-se uma predominância relativamente ao total de PUFA correspondendo a 15.7 % dos lípidos totais do músculo de lampreia-marinha, do qual o ácido predominante é o ácido pentadecílico (C15:0) correspondendo a 39.3 % do total de ácidos gordos ímpares. As bactérias normalmente utilizam estes ácidos gordos ímpares presentes nos lípidos em vez de ácidos gordos polinsaturados (Ackman, 1999). E como a fase larvar exibe uma fase trófica alimentando-se por filtração em áreas com sedimentos finos e baixos fluxos de água (Hardisty and Potter, 1971; Almeida and Quintella, 2002), a presença de bactérias é expetável nestes locais.

Para os SFA verifica-se uma predominância do ácido mirístico (42.3 %) seguido do ácido palmítico (23.8 %) relativamente ao total dos SFA. Em valores mais reduzidos, constata-se igualmente a presença do ácido pentadecílico e do ácido dodecanóico (C12:0), representando respetivamente 12.0 % e 9.6 % do total de SFA.

Relativamente aos ácidos gordos monoinsaturados, verificou-se a predominância do ácido palmitoléico seguido do ácido oleico representando respetivamente 57.1 % e 19.2 % do total de MUFA.

Para os ácidos gordos polinsaturados, verifica-se uma predominância do ácido EPA seguido do ácido AA e do ácido DHA representando respetivamente 25.0 %, 11.4 % e 10.8 % do total de PUFA. Os ácidos DHA e EPA pertencem à família ω 3 representando respetivamente 37.9 % e 16.3 % do total de ω 3, já o ácido AA pertencente à família ω 6 representando 35.6 % do total de ω 6.

Verifica-se que a família ω 7 é predominante em relação às restantes famílias de ácidos gordos correspondendo a 20.0 % dos ácidos gordos totais, dos quais o ácido palmitoléico é o ácido predominante correspondendo a 99.0 % da família ω 7. Seguido da família ω 9 com 10.9 % dos ácidos gordos totais, na qual o ácido preponderante da família corresponde ao ácido oleico (61.4 %). Em relação à família ω 6 correspondendo a 3.3 % dos ácidos gordos totais o ácido AA foi o ácido preponderante da família, correspondendo a 35.6 % do total de ω 6, seguido do ácido gordo LA e do ácido gordo docosadienóico (C22:2 ω 6) correspondendo respetivamente a 26.2 % e 10.4 % do total de ω 6. Para as famílias ω 5 e ω 8, verificou-se que são famílias com contribuições muito pequenas relativamente à percentagem média total de ácidos gordos, correspondendo respetivamente a 2.9 % e 1.1 %.

A razão entre o somatório dos ácidos gordos da família ω 3 e ω 6 apresenta percentagem superior > 1 (2.1 %), ou seja, à predominância da família ω 3, maioritariamente composta de EPA e DHA, relativamente à família ω 6.

Verifica-se a presença de ácidos gordos de forma *iso* e *anteiso* correspondendo respetivamente a 1.7 % e 1.6 % dos ácidos gordos totais. Para a forma *iso*, o ácido predominante corresponde ao ácido *iso*-pentadecanóico (i-C15:0) representando 75.1 % do total de ácidos de forma *iso*, para a forma *anteiso* o ácido predominante corresponde ao ácido *anteiso*-pentadecanóico (a-C15:0) e ácido *anteiso*-heptadecanóico (a-C17:0) representando respetivamente a 34.8 % e 30.4 % do total de ácidos de forma *anteiso*.

3.6. Comparação do perfil de ácidos gordos de lampreia-marinha entre a fase adulta e larvar

A partir da análise comparativa do somatório de índices de ácidos gordos (Figura 3.6.), expressa em percentagem média total, verifica-se para as lampreias-marinha juvenis uma ligeira predominância do total de SFA (51.6 %) relativamente a lampreias-marinha na fase adulta (48.8 %).

Para os restantes índices, verifica-se que os valores de total de PUFA e ácidos gordos ímpares são predominantes para indivíduos na fase larvar, com exceção do total de MUFA que são predominantes em indivíduos na fase adulta.

Em relação às famílias ómega obtidas, verifica-se para ambos os grupos estudados uma predominância das famílias $\omega 7$ e $\omega 9$, sendo os valores destas superiores para os indivíduos na fase adulta. Em contrapartida, verifica-se que os valores das famílias $\omega 3$, $\omega 5$, $\omega 6$ e $\omega 8$ são predominantes em lampreia-marinha na fase larvar.

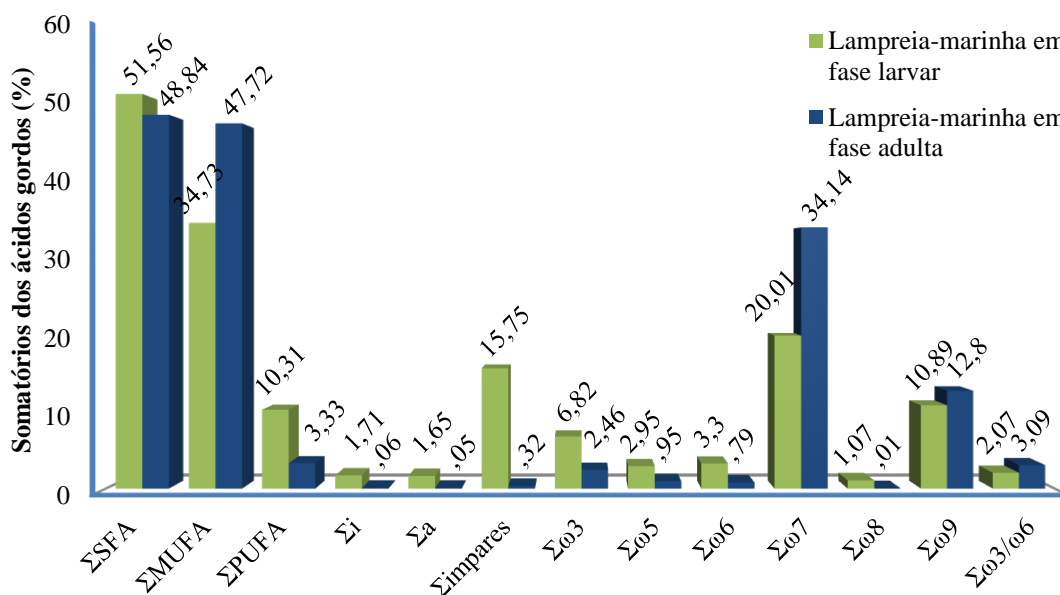


Figura 3.6. - Somatório das famílias de ácidos gordos e dos ácidos gordos ramificados identificados no músculo de lampreia-marinha em fase larvar e fase adulta.

A comparação dos perfis de ácidos gordos entre fase larvar e fase adulta foi feita recorrendo a um modelo geral linear (GLM). Verificou-se que o perfil de ácidos gordos entre a fase larvar e adulta foi significativamente distinto ($p = 0.037$, para um intervalo de confiança de 95 %).

O mesmo teste de GLM permitiu analisar os resultados para cada uma das variáveis dependentes (ácidos gordos identificados) em análise com o intuito de identificar possíveis marcadores individuais. Dos resultados obtidos apenas os ácidos gordos mirístico, *iso*-octadecanóico (i-C18:0), *anteiso*-octadecanóico (a-C18:0) e docosadienóico não revelaram diferenças significativas (valor de significância ≥ 0.05) entre os perfis. Segundo a análise das variáveis dependentes pode então concluir-se que o perfil de ácidos gordos entre a fase larvar e a fase adulta em início de migração reprodutiva é completamente distinto ($p < 0.05$), existindo apenas 4 ácidos gordos que se revelam idênticos em termos de percentagem.

A mesma análise foi realizada considerando apenas como variáveis dependentes os índices, com o objetivo de restringir o número de observações. Verificou-se para os índices utilizados, a fase larvar é significativamente distinta da fase adulta (< 0.05).

Procurou-se então detetar qual ou quais os índices que mais contribuíram para as diferenças entre os perfis das duas fases do ciclo de vida. Tendo-se verificado, o total de SFA foi o índice que contribuiu mais para as diferenças ($\eta = 95.8\%$) seguido do total de PUFA ($\eta = 83.8\%$). O total de MUFA foi o que menos contribuiu para as diferenças ($\eta = 59.3\%$). No entanto, para o índice referente ao total de ácidos gordos de cadeia ímpar verificou-se que contribuiu mais para as diferenças entre perfis ($\eta = 98.1\%$). No que diz respeito às famílias $\omega 8$, $\omega 7$ e $\omega 6$ foram as que mais contribuíram para as diferenças detetadas com ($\eta = 98.1\%$; $\eta = 88.0\%$ e $\eta = 88.0\%$ respetivamente). As famílias $\omega 5$ ($\eta = 56.9\%$) e família $\omega 9$ ($\eta = 23.4\%$) contribuíram com percentagens mais inferiores. A razão $\omega 3/\omega 6$ contribuiu com um $\eta = 58.9\%$ para a diferenças entre perfis.

Igualmente importante para as diferenças de perfis entre as duas fases foram os ácidos gordos dos grupos *iso* ($\eta = 93.0\%$) e *anteiso* ($\eta = 94.8\%$).

4. Conclusão e trabalho futuro

A análise do perfil de ácidos gordos do músculo de lampreia-marinha revelou que o perfil de ácidos é significativamente distinto entre as fases larvar e adulta.

No que diz respeito aos índices de ácidos gordos, o músculo de lampreia-marinha em fase adulta apresenta predominantemente ácidos gordos saturados, seguido de ácidos gordos monoinsaturados e ácidos gordos polinsaturados. A análise do perfil de ácidos gordos de lampreia-marinha em fase larvar verificou-se uma predominância de ácidos gordos saturados, seguido de ácidos gordos monoinsaturados e ácidos gordos de cadeia ímpar. É de referir que o total de ácidos gordos de cadeia ímpar contribuiu significativamente na diferenciação entre as duas fases do ciclo de vida da lampreia-marinha, particularmente na fase larvar. A predominância das famílias ómega para as lampreias em fase larvar é significativamente superior, com exceção da família $\omega 7$ e $\omega 9$ relativamente às lampreias-marinha adulta.

A lampreia-marinha em fase larvar pode ser caracterizada por uma percentagem de ácidos gordos polinsaturados e de ácidos gordos na forma *iso* e *anteiso*, comparativamente ao músculo de lampreia-marinha na fase adulta. É de mencionar que a família $\omega 8$ contribuiu significativamente na diferenciação entre as duas fases de lampreia-marinha pela presença significativa de ácidos gordos $\omega 8$ especialmente na fase larvar.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem-nos concluir que o perfil lipídico em ácidos gordos de lampreia-marinha poderá ser distinguido com base em alguns índices marcadores.

A utilização de outros padrões de FAME atualmente comercializáveis, com diferentes variedades de ácidos gordos, poderá auxiliar na identificação de picos no cromatograma e testar a existência de possíveis co-eluições. Tanto a aplicação de diferentes conjuntos de colunas cromatográficas, como a utilização de técnicas cromatográfica avançadas (ex: MDGC), poderá melhorar a resolução dos picos cromatográficos, assim como a identificação da posição das ligações duplas e/ou da forma isomérica, *cis* e *trans*. A temperatura experimental deverá ser estendida para temperaturas mais elevadas de forma a testar como reagem os ácidos gordos presentes na amostra biológica a diferentes intervalos de tempo.

5. Bibliografia

- Ackman, R. G. (1999) Comparison of Lipids in Marine and Freshwater Organisms. In: Art, M. T. & Wainman, B. C. (eds.) *Lipids in Freshwater Ecosystems*. New York, Springer. pp. 263–298.
- Afonso, C. I. M. (2009) Produtos da pesca capturados na costa portuguesa: Benefícios e perigos associados ao seu consumo. Tese de Doutoramento em Farmácia (Bromatologia). Faculdade de Farmácia - Universidade de Lisboa, Lisboa. pp. 243.
- Almeida, P.R., Quintella, B.R., 2002. Larval habitat of the sea lamprey (*Petromyzon marinus* L.) in the River Mondego (Portugal). In: Collares-Pereira, M.J., Coelho, M.M., Cowx, I.G. (Eds.), *Freshwater Fish Conservation: Options for the Future*. Blackwell Science, Oxford, England, pp. 121–130.
- APEA, Associação Portuguesa de Educação Ambiental. [Online] Disponível em: <http://aspea.org/v1/index.php/2015-06-24-20-23-19/2015-06-24-20-52-22/projetos/informacao>.
- Carballeira, R.N.M., Shalabi, F. (1995) The Rare Caribbean Sponge *Leucosolenia canariensis*: Phospholipid Fatty Acids and Sterols Lipids. *Journal of Lipids*, 30, pp. 467–470.
- Cejas, J. R., Almansa, E., Jérez, S., Bolaños, A., Samper, M. & Lorenzo, A. (2004). Lipid and fatty acid composition of muscle and liver from wild and captive mature female broodstocks of white seabream, *Diplodus sargus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B 138, pp. 91–102.
- Christie, W.W. (1993) Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. *Journal of Advances in Lipid Methodology*. 2nd Edition, Dundee, Scotland, pp. 69–111.
- Correia, A. A. D. & Correia, J. H. R. D. (1985) *Bioquímica Animal*. 2^a Edição, Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.

- Dawson, H. A.; Quintella, B. R.; Almeida, P. R.; Treble, A. J. and Jolley, J. C. (2015). The ecology of larval and metamorphosing lampreys. *Lampreys: Biology, Conservation and Control*. M. F. Docker, Springer Fish and Fisheries Series, USA pp. 75–137.
- Duarte, A. C. L., Jorge, I., Sobral, M. P., Rebordão, F. R., Martins, R. & Carneiro, M. (2003) *Rendimento do botirão usado na captura da lampreia *Petromyzon marinus* L. 1758 no estuário do Rio Mondego*. IPIMAR. Relatório nº: 8.
- Graff, G., Anderson, L.A., Jaques, L.W. & Scannell, R.T. (1990) Evidence for the formation of 2-hydroxyethyl esters by reaction of fatty acids with diazomethane in diethyl ether. *J. Chem. Phys. Lipids*, 53, pp. 27-36.
- Grob, R.L.; Barry, E.F (2004) *Modern practice of gas chromatography*, 3ª Edição, pp. 25–65, 277–490, Hoboken: Wiley-Interscience, pp. 30.
- Hardisty, M. W. (1986) *Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758. In: Holčík, J. (ed.) *The freshwater fishes of Europe* Vol. 1, Part I. Wiesbaden, Aula-Verlag. pp. 94–116.
- Hardisty, M.W., Potter, I.C., (1971). The behaviour, ecology and growth of larval lampreys. In: Hardisty, M.W., Potter, I.C. (Eds.), *The Biology of Lampreys*, Vol 1. Academic Press, London, pp. 85–125.
- Hardisty, D. R. and Neale, S. M. (1960), The use of permselective membranes to determine the activity of the counterion in some polyelectrolyte solutions. *J. Polym. Sci.*, 46, pp. 195–209.
- Hardisty, M. W. & Potter, I. C. (1971a) The behaviour, ecology and growth of larval lampreys. In: Hardisty, M. W. & Potter, I. C. (eds.) *The biology of lampreys, Volume I*. London, Academic Press. pp. 85–125.
- Henderson, J. R. & Tocher, D. R. (1987) The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progress in Lipid Research*, 26, pp. 281–347.
- Higson, S. (2004). *Analytical chemistry*. Oxford: Oxford University Press.
- Iglésias S. P. (2013) Chondrichthyans and Cyclostomata from the North-eastern Atlantic and the Mediterranean (A natural classification based on collection specimens, with DNA

barcodes and standardized photographs). *Muséum National d'Histoire Naturelle*, versão provisória 07. p. 105. [Online] Disponível em: <http://www.mnhn.fr/iccanam>.

- Janvier, P. (2007) Living primitive fishes and fishes from deep time. In: McKenzie, D. J., Farrel, A. P., & Brauner, C. J. (Ed.) *Primitive Fishes*. San Diego, Academic Press. pp. 1–51.
- Kleiman, R., Spencer, G.F., Earle, F.R. (1968) Boron Trifluoride as Catalyst to Prepare Methyl Esters from Oils Containing Unusual Acyl Groups Lipids, 4, pp. 11–122.
- Koolman, J. & Roehm, K. H. (2005) *Color Atlas of Biochemistry*. Second edition. New York, Thieme.
- Lehninger, AL., Nelson, D.L., Cox, M.M. (1993) Principles of biochemistry. 2nd ed., New York: Worth, pp. 1013.
- Larsen, L. O. (1980) Physiology of Adult Lampreys, with Special Regard to Natural Starvation, Reproduction, and Death after Spawning. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37, pp. 1762–1779.
- Machado, M. A. P. A. (2010) Determinação e utilização do perfil em ácidos gordos dos lípidos totais do músculo cardíaco para caracterização de populações de *Petromyzon marinus*, L. nas várias bacias hidrográficas portuguesas. Tese de Mestrado em Bioquímica. Escola de Ciências e Tecnologia - Universidade de Évora, Évora. pp. 93.
- Mateus, C. S., Alves, M. J., Quintella, B. R. & Almeida, P. R. (2013) Three new cryptic species of the lamprey genus *Lampetra* Bonnaterre, 1788 (Petromyzontiformes : Petromyzontidae) from the Iberian Peninsula. *Contributions to Zoology*, 82, pp. 37–53.
- Mayes, P. A. & Botham, K. M. (2003) Lipids of Physiologic Significance. In: Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A. & Rodwell, V. W. (Ed.) *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26th Edition. McGraw-Hill Companies. pp. 111–121.
- MJOS, S.A. (2006) Prediction of equivalent chain lengths from two-dimensional fatty acids retention indices. *Journal of Chromatography, A*, V.1122, n.1/2, pp. 249–254.

- Morrison, W. R. & Smith, L. M. (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Journal of Lipid Research*, 5 (1-3), pp. 600–608.
- Murray, J. & Burt, J. R. (2001) The Composition of Fish. Torrey Research Station. Torrey Advisory Note number: 38.
- Nelson, J. S. (2006) *Fishes of the World*. New Jersey, John Wiley & Sons.
- Olsen, Y. (1999) Lipids and essential fatty acids in aquatic food webs: what can freshwater ecologists learn from mariculture? In: Wetzel, R. G. (ed.) *Lipids in Freshwater Ecosystems*. New York, Springer-Verlag. pp. 161–202.
- Özogul, Y. & Özogul, F. (2007) Fatty acid profiles of commercially important fish species from the Mediterranean, Aegean and Black Seas. *Food Chemistry*, 100, 1634–1638.
- Ozogul, Y., Polat, A., Uçak, İ. & Ozogul, F. (2011) Seasonal fat and fatty acids variations of seven marine fish species from the Mediterranean Sea. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113, 1491–1498.
- Parrish, C. C. (2009) Essential Fatty Acids in Aquatic Food Webs. In: Arts, M. T., Brett, M. T. & Kainz, M. J. (eds.) *Lipids in Aquatic Ecosystems*. New York, Springer. pp. 309–326.
- Phillips, J., Liu, Z. (1991) Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography using an On-Column Thermal Modulator Interface. *J. Chromatography Sci*, 29, pp. 227–231.
- Pinela, S., Quintella, B., Almeida, P. & Lança, M. J. (2009) Comparison of the fatty acid profile of muscle neutral lipids and phospholipids of up-river anadromous sea lamprey (*Petromyzon marinus* L.) from three Portuguese river basins. *Scientia Marina*, 73, pp. 785–795.
- Potter G., Budge S.M., Speers R.A. (2015) Beyond diazomethane: alternative approaches to analyzing non-esterified fatty acids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 117, pp. 908–917.
- Prato, E. & Biandolino, F. (2012) Total lipid content and fatty acid composition of commercially important fish species from the Mediterranean, Mar Grande Sea. *Food Chemistry*, 131, pp. 1233–1239.

- Pratt, C. W. & Cornely, K. (2014) Essential Biochemistry. 3rd Edition, USA, John Wiley & Sons.
- Quintella, B. R., Andrade, N. O. & Almeida, P. R. (2003) Distribution, larval stage duration and growth of the sea lamprey ammocoetes, *Petromyzon marinus* L., in a highly modified river basin. *Ecology of Freshwater Fish*, 12, pp. 286–293.
- Rouessac, F.; Rouessac, A. (2005) *Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques* 2nd Edition, West Sussex: John Wiley & Sons.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D. & Estevez, A. (1999) Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, 177, pp. 191–199.
- Scrimgeour, C. M. & Harwood, J. L. (2007) Fatty Acid and Lipid Structure. In: Gunstone, F. D., Harwood, J. L. & Dijkstra, A. J. (eds.) *The Lipid Handbook*. 3rd edition, New York, CRC Press. pp. 1–36.
- Silva S., Servia M. J., Vieira-Lanero R., Barca S. & Cobo F. (2013) Life cycle of the sea lamprey *Petromyzon marinus*: duration of and growth in the marine life stage. *Aquatic Biology*, 18, pp. 59-62.
- Smith, A.D., (2000) Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, Rev. ed. Oxford University Press, Oxford.
- Souza, S., Anido, R. & Tognon, F. (2007) Ácidos graxos Ômega-3 e Ômega-6 na nutrição de peixes – fontes e relações. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 6, pp. 63–71.
- Steffens, W. (1997) Effects of variation in essential fatty acids in fish feeds on nutritive value of freshwater fish for humans. *Aquaculture*, p. 151 (1-4), pp. 97–119.
- Swink WD, Johnson NS (2014) Growth and survival of Sea Lampreys from metamorphosis to spawning in Lake Huron. *Trans Am Fish Soc* 143, pp. 380–386.
- Tocher, D. R. (2003) Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11 (2), 107–184.

- Ventura, H. (2014) Qualidade nutricional do perfil lipídico da carne de lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*, L.) utilizada em consumo humano. Master Thesis. Universidade de Évora. Portugal.
- Voet, D. & Voet, J. D. (1995) Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc., United States of America.
- Wren, J. J. & Szczepanowska, A. D. (1964). J. Chromatography, 15, pp. 404–410.